

Maarit Rautiainen ja Heli Toivonen

# Kohdeproteiinin puhdistaminen vasta-aineiden tuotantoa varten ja IEMA-testin optimointi liittyen endometrioosin diagnostiikkaan

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko (AMK)

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

21.4.2016

Tekijä(t) Otsikko  Sivumäärä Aika	Maarit Rautiainen ja Heli Toivonen Kohdeproteiinin puhdistaminen vasta-aineiden tuotantoa varten ja IEMA-testin optimointi liittyen endometrioosin diagnostiikkaan  40 sivua + 4 liitettä 21.4.2016
Tutkinto	Bioanalytiikka (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Ohjaaja(t)	Lehtori Hannele Pihlaja Tutkimus- ja tuotekehityspäällikko Juuso Juhila
<p>Endometrioosi on sairaus, jossa kohdun limakalvon kaltaista kudosta esiintyy kohdun ulkopuolella. Endometrioosin nykydiagnostiikka on haasteellista, sillä siihen ei ole vielä spesifistä tutkimusmenetelmää ja samankaltaisia oireita tavataan myös muissa sairauksissa. Endometrioosia esiintyy jopa 10 %:lla hedelmällisessä iässä olevilla naisilla ja tutkimusten mukaan jopa 50 %:lla lapsettomuuspotilaista. Endometrioosiin ei ole parantavaa hoitoa ja se vaikuttaa naisen hedelmällisyyteen sekä heikentää potilaan terveyteen liittyvää elämänlaatua.</p> <p>Opinnäytetyö oli osa Medix Biochemican kumppanuus-diagnostiikkaprojektia, joka tähtää endometrioosin uudenlaiseen diagnostiikkaan ja lääkehoidon kehittämiseen yhteistyökumppaneiden kanssa. Opinnäytetyön tarkoituksena oli puhdistaa kohdeproteiini-2:ta sekä optimoida diagnostista IEMA-testiä kohdeproteiini-1:lle.</p> <p>Tavoitteina oli puhdistaa kohdeproteiini-2 niin, että sitä voidaan tulevaisuudessa käyttää sille spesifisten vasta-aineiden kehitykseen. Toisena tavoitteena oli löytää diagnostiselle IEMA-testille sopivin näytemateriaali ja laimennossuhde. Tavoitteena oli myös saada selville lääkeaineen vaikutus testin toimintaan eli sitoutuuko proteiini-1 kuoppalevyn pohjalla olevaan vasta-aineeseen lääkeaineen läsnäolosta huolimatta ja pystyykö tällöin myös HRP-leimattu vasta-aine sitoutumaan.</p> <p>Tulokset vahvistivat kohteena olevan proteiini-2:n puhdistuksen olevan haasteellista. Varmaa tietoa puhtaan proteiinin määrästä eikä sen puhtaudesta saatu. IEMA-testin optimoinnissa saatiin selville, että paras laimennossuhde oli 1:8 ja paras näytemateriaali seerumi. Testin optimoinnin toisessa työssä huomattiin, että endometrioosin hoitoon kehitetty lääkeaine ei vaikuta IEMA-testin toimintaan.</p>	
Avainsanat	endometrioosi, proteiinien puhdistus, diagnostinen testi, kumppanuus-diagnostiikka

Author(s) Title	Maarit Rautiainen ja Heli Toivonen Protein purification for antibody production and optimising IEMA test concerning diagnostics of endometriosis
Number of Pages Date	40 pages + 4 appendices 21 April 2016
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Senior Lecturer Hannele Pihlaja R&D Manager Juuso Juhila
<p>Endometriosis is a disease in which the tissue similar to the endometrium is found outside the uterus. Currently the diagnostics of endometriosis is challenging, because there is no specific diagnostic test yet available and similar symptoms also occur in other diseases. It is estimated that endometriosis occurs in up to 10 % of female at reproductive age and according to studies even 50 % of infertile females have endometriosis. There is no medical treatment for endometriosis and it affects to female's fertility as well as impairs the health-related quality of life.</p> <p>This thesis is a part of Medix Biochemica's Companion-Diagnostics-project. The aim of the project is to develop a new diagnostic device and treatment for endometriosis with co-operation with pharmaceutical partner. The purpose of this thesis was to purify protein-2 and to set-up and optimise a diagnostic IEMA-test to measure protein-1 concentration from patient samples.</p> <p>Technical purpose of this work was to purify protein-2 so that it could be used for antibody production in the future. Additional aim was to verify a suitable sample material and dilution ratio for measurement of protein-1 concentration by IEMA-test. There was also an interest in knowing if the drug under development has an influence on the performance of IEMA-test. In detail was tested, does the protein-1 bind to the antibody despite in the presence of the drug and in that case is the HRP-labeled antibody also capable for binding.</p> <p>Precise information about the purity and amount of the protein-2 after purification was not gained. Results from the IEMA-test after optimisation indicated that the best sample material was serum with the dilution 1:8. It was also discovered that the drug under development for the treatment of endometriosis doesn't have effect on the performance of the IEMA- test</p>	
Keywords	Endometriosis, protein purification, diagnostic test, companion diagnostics

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Endometrioosi	2
2.1	Endometrioosi	2
2.2	Diagnosointi	4
3	Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoitteet	5
4	Proteiinien tuotto ja puhdistus	6
4.1	Rekombinanttiproteiinin tuotto	7
4.2	Näytteen esivalmistelu	7
4.3	Puhdistus	8
4.3.1	ÄKTA prime plus -laite	9
4.4	SDS-PAGE	9
4.5	Vasta-aineiden tuottaminen puhdistetulla antigeenillä	10
5	Diagnostisen testin kehittäminen	11
5.1	ELISA-menetelmän periaatteet	11
5.2	Matrix Spiking-menetelmän periaatteet	13
6	Käytännön toteutus ja menetelmät	13
6.1	Opinnäytetyön toteutus	13
6.2	Kohdeproteiini-2:n puhdistus	14
6.2.1	Näytteiden erottelu SDS-PAGE:lla	15
6.3	IEMA-testin kehittäminen ja optimointi kohdeproteiini-1:tä varten	16
6.3.1	Osatyö 1: Matriisivaikutuksen selvittäminen IEMA-testin toimintaan	16
6.3.2	Osatyö 2: Lääkeaineen vaikutuksen selvittäminen IEMA-testin toimintaan	17
7	Tulokset	18
7.1	Kohdeproteiini-2:n puhdistus	18
7.2	IEMA-testin optimointi	19
7.2.1	Osatyö 1: Matriisivaikutuksen selvittäminen IEMA-testin toimintaan	19
7.2.2	Osatyö 2: Lääkeaineen vaikutuksen selvittäminen IEMA-testin toimintaan	28

8	Tulosten luotettavuus ja etiikka	30
9	Johtopäätökset	33
9.1	Puhdistus	33
9.2	IEMA-testin optimointi	34
10	Pohdinta	36
	Lähteet	38

#### Liitteet

Liite 1 Puhdistus 1 kromatogrammi

Liite 2 Puhdistus 2 kromatogrammi

Liite 3 SDS-PAGE kuvat puhdistuksista

Liite 4 Osatyön 1 naisen ja miehen näytteiden konsentraatiot ja saantoprosentit

## 1 Johdanto

Endometrioosi on kohdun limakalvon sirottumatauti, jota esiintyy jopa 10 %:lla hedelmällisessä iässä olevilla naisilla. Endometrioosin diagnostiikka on tällä hetkellä ongelmallista, sillä samankaltaisia oireita tavataan myös muissa sairauksissa, kuten suolistontulehdussairauksissa, adenomyoosissa ja interstitiaalisen virtsarakon tulehduksessa. (Perheentupa - Santala 2011:93–101.) Endometrioosin diagnosointi voikin siis viivästyä useita vuosia ja erään kansainvälisen tutkimuksen mukaan endometrioosin diagnosointi vie keskimäärin jopa 6,7 vuotta. Endometrioosi vaikuttaa naisen hedelmällisyyteen sekä heikentää myös potilaan terveyteen liittyvää elämänlaatua sekä työnteon tuotteliaisuutta. (Nnoaham ym. 2011: 366–373.)

Opinnäytetyöprojekti koostui kahdesta tuotekehitykseen liittyvästä osiosta: kohdeproteiini-2:n puhdistuksesta ja IEMA-testin optimoinnista. Opinnäytetyö tehtiin Medix Biochemicalle, joka on suomalainen bioteknologiayritys. Opinnäytetyö oli osa Medix Biochemican suurempaa kumppanuus-diagnostiikkaprojektia, jolla pyritään yhteistyössä lääkevalmistajan kanssa kehittämään hoito- ja diagnostiikkamenetelmä endometrioosiin. Kumppanuus-diagnostiikka on lääketieteellinen, usein in vitro -diagnostinen (IVD) menetelmä, joka on suunniteltu käytettäväksi yhdessä spesifisen lääkkeen kanssa. Projektin tavoitteena on tuottaa diagnostinen menetelmä, jolla voidaan todeta endometrioosi, valita uudesta endometrioosilääkityksestä hyötyviä potilaita ja seurata lääkehoidon tehoa valituilla potilailla. Parhaimmassa tapauksessa kumppanuus-diagnostiikka lisää lääketurvallisuutta, ohjaa yksilöllistä räätälöityä lääkehoitoa sekä lyhentää lääkekehityksen pitkää kestoaikaa, minkä seurauksena hyödyllisiä lääkkeitä saadaan nopeammin niitä tarvitsevien käyttöön. (FDA 2014a.)

Puhdistamalla proteiineja saadaan tietoa niiden biokemiallisesta toiminnasta, rakenteesta ja vuorovaikutuksesta muiden biomolekyylien ja organismien kanssa. Puhdistuksen tarkoituksena on eliminoida epäpuhtaudet ja saada lopputuloksena puhdasta proteiininäytettä. (Campbell – Farrel 2006: 113.) Proteiineja voidaan puhdistaa käyttämällä kromatografista menetelmää, joka erottaa ne toisistaan niiden ominaisuuksien perusteella (Recombinant protein purification 2012: 5). Puhdistettua proteiinia voidaan käyttää monoklonaalisten vasta-aineiden tuottoon (Happonen ym. 2013:150–151).

Diagnostisen IEMA-testin kehittäminen ja optimointi potilasnäytteille voidaan tehdä käyttäen entsyymivälitteistä immunosorbenttimääritystä eli ELISA-menetelmää, jossa antigeenit sitoutuvat niille spesifisiin vasta-aineisiin (Janeway 2001:619–620). ELISA -menetelmästä on kehitetty erilaisia variaatioita, jollainen myös tässä opinnäytetyössä kehitetty IEMA-testi (immunoenzymometric assay) on. Spesifisen ELISA-testin kehittäminen ja optimointi voi olla vaikeaa. Testin pystyttäminen vaatii erilaisia komponentteja, joten tuloksen saaminen voi epäonnistua johtuen useista eri tekijöistä kuten vasta-aineista, puskureista ja mittauksen mahdollistavista leimoista. Lisäksi käytetyt potilasnäytteet voivat sisältää testin toimintaan vaikuttavia epäpuhtauksia. Tätä niin kutsuttua matriisivaikutusta voidaan aluksi tutkia potilasnäytteiden kaltaisilla näytteillä, joihin on lisätty tutkittavaa antigeeniä. Tästä menetelmästä käytetään nimitystä Matrix Spiking (spaikkaus). (Thermo Scientific 2010: 2–6.)

## **2 Endometrioosi**

### **2.1 Endometrioosi**

Endometrioosi on kohdun limakalvon sirottumatauti. Käytännössä se tarkoittaa sitä, että kohdun limakalvon tapaista kudosta esiintyy kohdun ulkopuolella. Kudospesäkkeet sijaitsevat yleensä vatsakalvolla, emättimen ja peräsuolen välissä sekä munasarjojen pinnalla. Endometrioosia esiintyy jopa 10 %:lla hedelmällisessä iässä olevista naisista eikä siihen ole parantavaa hoitoa. (Perheentupa - Santala 2011:93–101.) On arvioitu, että 6-20 % lapsettomuuden syistä johtuu endometrioosista (Tiitinen 2010) ja tutkimusten mukaan jopa 50 %:lla lapsettomuuspotilaista esiintyy endometrioosia (Meuleman ym. 2009). Endometrioosin syntymekanismia ei tunneta tarkasti, mutta erään teorian mukaan kohdun limakalvon kappaleita kulkeutuu kuukautisveren mukana vatsaonteloon, jossa ne kiinnittyvät ja muodostavat pesäkkeitä vatsakalvoon (Huhtinen ym 2011). Kappaleiden kiinnittyminen vatsakalvoon vaatii häiriötä muun muassa potilaan immuunijärjestelmässä (Perheentupa - Santala 2011:93–101). Vuotoa kutsutaan retrogradiseksi vuodoksi, jota arvellaan ilmentyvän noin 90 %:lla hedelmällisessä iässä olevilla naisilla. Vuoto ei kuitenkaan itsessään selitä endometrioosin syntyä. (Huhtinen ym 2011.)

Vatsaonteloon kulkeutunut kohdun limakalvosolukko tunkeutuu kudokseen ja aktivoi angiogeneesin eli verisuonituksen syntymisen. Tunkeutuminen kudokseen vaatii solun ulkoisen väliaineen hajottamista matriksin metalloproteinaaseilla (MMP). Näiden entsyymien rooli on tärkeä kuukautisvuodossa ja niiden tuotto lisääntyy kuukautiskierron lopulla. MMP-entsyymit hajottavat kohdun limakalvoa. MMP-entsyymejä ilmenee endometriosikudoksessa, mikä lisää sen kykyä hajottaa kudosta, johon se on kiinnittynyt. MMP:n estäjäproteiinien (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP) pitoisuudet ovat vähentyneet endometriosikudoksessa, mikä osaltaan lisää MMP-entsyymien vaikutusta. (Huhtinen ym 2011.)

Tauti voidaan jakaa pinnalliseen eli peritoneaaliseen endometrioosiin, syvään endometrioosiin ja munasarjan endometrioosiin eli endometrioomaan. Pinnallista endometriosia esiintyy vatsakalvolla, vatsaontelon elinten pinnalla sekä myös munasarjojen pinnalla pistemäisinä tai laattamaisina pesäkkeinä. Peritoneaalinen muutos tunnistettiin aluksi vain tummiksi leesioiksi, mutta nykyään on opittu tunnistamaan myös vaaleita, kirkkaita ja punaisia rakkulaisia muutoksia. On arvioitu, että erinäköiset muutokset liittyisivät taudin eri kehitysvaiheisiin, mutta täyttä varmuutta asiasta ei ole saatu. (Perheentupa - Santala 2011: 93–101.)

Syvässä endometriosissa pesäkkeet kasvavat yli 5 millimetrin syvyyteen viereiseen kudokseen. Osa syvistä endometriosipesäkkeistä saa alkunsa kun pinnalliset pesäkkeet tunkeutuvat syvemmälle kudokseen. (Huhtinen 2011.) Syvässä endometriosissa on vaaleita kovia ja arpimaisia pesäkkeitä, jotka aiheuttavat oireita sijaintinsa mukaan (Härkki – Heikkinen – Setälä 2011).

Endometrioomassa kystamainen pesäke ilmenee munasarjojen pintaepiteelin alla tuhoten normaalia munasarjakudosta. Munasarjan endometrioosi voi saada alkunsa muun muassa munasarjan pinnallisista pesäkkeistä. Niistä vuotaa verta, joka kertyy munasarjoihin ja saa kuorikerroksen kiertymään munasarjan sisään. Toisen teorian mukaan endometriooman on arveltu saavan alkunsa keltarauhasesta. Metaplasian on arveltu olevan myös syy endometriooman syntyyn, jolloin munasarjan pintaepiteeli muuttuu endometriosikudokseksi. (Huhtinen 2011.) Endometriooma voi ilmetä vain toispuolisena ja kasvaa isoksi aiheuttaen vain vähän oireita. Endometriooman ilmentymä molemmissa munasarjoissa voi aiheuttaa munasarjojen "liimautumisen" yhteen ja yleensä molemminpuoliseen endometrioomaan liittyy myös pesäkkeiden kasvua muualla kehossa. (Perheentupa - Santala 2011:93–101.)



Endometrioosin riskitekijöihin kuuluu muun muassa perimä, sillä ensimmäisen asteen sukulaisilla on jopa yhdeksän kertainen riski sairastua endometrioosiin. Muita riskitekijöitä ovat ylipaino, runsas kuukautisvuoto ja lyhyt kuukautiskierto. Endometrioosin tyypillisimpiin oireisiin kuuluvat vaikeat kuukautiskivut, joita ilmenee jo muutama päivä ennen kuukautisten alkua. Muita tavallisia oireita ovat vatsa- ja yhdyntäkivut, sekä virtsarakon ja suolen toimintaan liittyvät kivut, riippuen siitä, mihin elimiin tauti liittyy. Pesäkkeet suolistossa aiheuttavat ulostuskipuja, virtsarakkopesäkkeet virtsaamiskipuja ja emättimen ja peräsuolen välisessä seinämässä oleva pesäke voi aiheuttaa yhdyntä- ja ulostuskipuja. (Härkki – Heikkinen – Setälä 2011.) Toisinaan endometrioosipotilas saattaa olla myös täysin oireeton tai ainoa oire voi olla hedelmättömyys (Perheentupa - Santala 2011:93–101).

## 2.2 Diagnosointi

Endometrioosin diagnosointi on vaikeaa ja hidasta. Eräs kansainvälinen tutkimus on osoittanut, että endometrioosin diagnosointi vie keskimäärin 6,7 vuotta (Nnoaham ym. 2011: 366–373). Endometrioosin diagnostiikka on ongelmallista, koska samankaltaisia oireita tavataan myös suoliston tulehdussairauksissa, adenomyoosissa ja interstitiellissä kystiitissä. Joskus oireena voi olla vain hedelmättömyys eli infertiliteetti. (Perheentupa - Santala 2011:93–101.)

Koska endometrioosi oireilee yleisimmin kuukautiskierron loppupuolella tai vuodon aikana, on kliininen tutkimus kannattavinta tehdä silloin. Spekulatutkimuksella vaginasta etsitään aristavia endometriosipesäkkeitä. Lisäksi voidaan käyttää apuna erilaisia kuvantamismenetelmiä, esimerkiksi ultraäänitutkimusta, jonka avulla nähdään taudille tyypilliset munasarjamuutokset. Magneettikuvausta tarvitaan, kun etsitään syviä pesäkkeitä erityisesti suolen alueelta tai suunniteltaessa leikkaushoitoa. (Perheentupa - Santala 2011:93–101.)

Gynekologisten syöpien diagnosointiin käytettävä seerumin merkkiaine CA-12-5 suurentuu lievästi vain hankalissa endometrioositaudeissa, joten siitä ei ole hyötyä endometrioosin tunnistamisessa (Perheentupa - Santala 2011:93–101). Joissain tutkimuksissa on todettu, että lievää endometrioosia voidaan diagnosoida tutkimalla kuukautisten aikana otetusta verikokeesta plasman tulehduksellisia biologisia merkkiaineita, kuten IL-6 ja IL-8, koska näiden merkkiaineiden tasot nousevat endometrioosin aikana (Mihalyi ym. 2010; Vodolazkaia ym. 2012). Tosin näiden merkkiaineiden tasot nousevat

myös akuutin faasin reaktioissa kuten infektioiden, tulehdusten ja kudosaivurioiden (Janeway ym 2001: 70–80).

Merkittävä osa taudista voidaan todeta vain leikkauksessa (Perheentupa - Santala 2011:93–101). Vatsaontelon tähytyksen perusteella tauti luokitellaan kansainvälisten kriteerien perusteella vaikeusasteittain lievistä kohtalaiseen, vaikeaan ja hyvin vaikeaan endometrioosiin (Paavonen 2009: 391 – 392). Myöskään laparoskopiassa diagnoosin tekeminen ei ole helppoa, sillä ulkonäöltään erilaisien pesäkkeiden tunnistaminen on vaativaa. Laparoskopia ei kuitenkaan ole välttämättömien toimenpiteiden diagnoosin varmistamiseen, mikäli oireet helpottavat hoidon yhteydessä. (Perheentupa - Santala 2011:93–101.)

### 3 Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoitteet

Opinnäytetyö tehtiin yhteistyössä työelämän kanssa ja se oli osa diagnostisen tuotekehityksen esiselvitysvaihetta. Medix Biochemica oli aloittanut syksyllä 2015 oman tutkimuksen liittyen kyseisten proteiinien (kohdeproteiini-1 ja kohdeproteiini-2) rooleista endometrioosin diagnosoinnissa. Opinnäytetyö oli osa Medix Biochemican aloittamaa laajempaa ja pitkäaikaisempaa kumppanuus-diagnostiikkaprojektia. Medix Biochemica oli tuottanut yhteistyön kautta kyseiset kiinnostuksen kohteena olevat proteiinit, mutta he eivät olleet vielä puhdistaneet toista kohdeproteiini-2, kun opinnäytetyön käytännön osuus aloitettiin. Kohdeproteiini-1 oli jo puhdistettu ja sen avulla oli tuotettu vastaaineita jo ennen opinnäytetyön alkua. Kohdeproteiini-1 antigeeniä ja sitä vastaan tuotettuja vastaaineita voitiin hyödyntää opinnäytetyössä diagnostisen IEMA-testin kehittämisessä ja optimoinnissa.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli puhdistaa erästä hyönteissoluviljelmissä tuotettua antigeeniä, kohdeproteiini-2:ta. Tämän lisäksi optimoitiin diagnostista IEMA-testiä. IEMA-testin optimointi jaettiin kahteen eri osioon, jossa ensimmäisessä osatyössä oli tarkoituksena tutkia onko naisen ja miehen erilaisten näytemateriaalien, seerumin ja plasman, välillä näytematriisista johtuvia mittausteknisiä eroja. Osatyössä 1 haluttiin myös testata näytemateriaaleilla eri laimennossuhteita, joilla saadaan luotettavimmin määritettyä oikea spaikattu pitoisuus. Toisessa osatyössä 2 oli tarkoitus testata kohdeproteiini-1:een sitoutuvan endometrioosin hoitoon suunnitellun lääkeaineen vaikutusta IEMA-testin toimintaan seeruminäytematriisissa.

Opinnäytetyön yhtenä tavoitteena oli saada puhdistettua kohdeproteiini-2 niin, että sitä voisi tulevaisuudessa käyttää kohdeproteiini-2:lle spesifisten vasta-aineiden kehitykseen. Toisena tavoitteena oli kehittää ja optimoida toimiva IEMA-testi toisen proteiinin (kohdeproteiini-1) pitoisuuksien luotettavaan mittaamiseen potilasnäytteistä. Tavoitteena oli löytää sopivin näytemateriaali ja laimennossuhde. Tavoitteena oli myös saada selville, että sitoutuuko kohdeproteiini-1 kuoppalevyn pohjalla olevaan vasta-aineeseen lääkeaineen läsnä ollessa ja pystyykö HRP (*Horseradish Peroxidase*) -leimattu vasta-aine tällöin sitoutumaan antigeeniin, eli vaikuttaako seerumeihin lisätty lääkeaine IEMA-testin toimintaan.

Opinnäytetyötä ohjasivat seuraavat tutkimuskysymykset:

1. Onnistuuko kohdeproteiini-2:n puhdistus opinnäytetyössä käytetyllä menetelmällä?
2. Onko miehen ja naisen erilaisten näytemateriaalien välillä eroja?
3. Onko lääkeaineella vaikutusta IEMA-testin toimintaan?

## 4 Proteiinien tuotto ja puhdistus

Puhdistamalla proteiineja saadaan tietoa niiden biokemiallisesta toiminnasta, rakenteesta ja vuorovaikutuksesta muiden biomolekyylien ja organismien kanssa. Proteiinien puhdistukseen käytetään monia menetelmiä, joiden tarkoitus on eliminoida epäpuhtaudet ja saada lopputuloksena mahdollisimman puhdasta proteiininäytettä. (Campbell – Farrel 2006: 113.)

Yksittäisen proteiinin eristys, puhdistus ja rakenteen määrittäminen on äärimmäisen vaikeaa, koska solut sisältävät tuhansia erilaisia proteiinimolekyyliä (Campbell – Farrel 2006: 113). Vain harvoja proteiineja voidaan helposti eristää ja puhdistaa suoraan soluista tai kudoksista. Yhdistelmä-DNA-tekniikan avulla voidaan kuitenkin tuottaa haluttua proteiinia suuria määriä, joka helpottaa sen puhdistamista. Käytännössä se tarkoittaa sitä, että tiettyä proteiinia koodittava geenijakso siirretään tuottoisäntään. Kun siirretty geeni ilmentyy eli ekspressoituu, se alkaa monistua ja proteiinin tuotto alkaa. (Suominen – Pärssinen – Haajanen – Pelkonen 2013: 71.) Yhdistelmä-DNA-tekniikan avulla tuotettuja proteiineja kutsutaan rekombinanttiproteiineiksi (Brown 2006: 374).

#### 4.1 Rekombinanttiproteiinin tuotto

Rekombinanttiproteiineja tuotetaan käyttämällä apuna erilaisia isäntäsoluja, kuten esimerkiksi hyönteissoluja, bakteereita, hiivoja sekä nisäkässoluja. Isäntäsolu vaikuttaa proteiinin tuotantoon ja siihen, miten tuote voidaan myöhemmin puhdistaa. Isäntäsolun valintaan vaikuttaa halutun tuotteen määrä ja puhtausaste, sekä sen biologinen eheys ja potentiaalinen myrkyllisyys. (Recombinant protein purification 2012: 9 – 10.)

Proteiinien tuottamiseen tarvitaan vektori, jolla on isäntäsolulle sopiva monistamisen eli replikaation aloitusalue, säätelyalueita sekä alue tuotettavaa proteiinia koodaavalle siirtogeenille. Vektoriin on myös liitetty antibioottiresistenssialue, jonka avulla solu on vastustuskykyinen elatusaineen antibiootille soluviljelyn aikana. (Recombinant protein purification 2012: 9 – 10; Aittomäki ym. 2002: 62–63). Vektori eli siirtäjä on biologinen kuljetin, jonka avulla siirrettävä geeni saadaan haluttuun isäntäsoluun (Happonen ym. 2013: 105, 180). Vektoreina voidaan käyttää muun muassa plasmideja, jotka ovat pieniä rengasmaisia DNA-molekyylejä (Suominen ym. 2013: 66). Isäntäsolu määrää pitkälti vektorin valinnan ja on tärkeää valita oikeanlainen vektori, sillä se vaikuttaa sekä proteiinien oikeanlaiseen monistumiseen, että jatkossa proteiinien prosessointiin ja puhdistamiseen (Recombinant protein purification 2012: 9 – 10).

Geenin siirron jälkeen isäntäsolut siirretään elatusaineelle, jossa on isäntäsolun kasvulle tärkeitä ravinteita ja antibioottia (Aittomäki ym. 2002:63). Tuotteen viljely elatusaineelle vähentää kontaminoivia ei-toivottuja proteiineja. Elatusaineen ja antibiootin avulla lisääntyvät vain halutut solut, joilla on haluttu plasmidi. (Recombinant protein purification 2012: 9 – 10.)

#### 4.2 Näytteen esivalmistelu

Puhdistettava näyte täytyy vielä käsitellä ennen varsinaisen proteiinin puhdistusta. Viljeltyt solut erotetaan elatusaineesta yleensä sentrifugoimalla tai suodattamalla. Seuraavassa vaiheessa proteiini eristetään solusta käyttäen hyväksi soluhajotusta, entsymaattista pilkkomista, jauhantaa hioma-aineella, kuten lasihelmillä, tai jäädyttämistä ja sulattamista. Käsittelymenetelmät valitaan proteiinin lähteen mukaan riippuen siitä, onko se tuotettu bakteeri- tai nisäkässoluissa ja ilmentyykö tuotettu proteiini solun sisällä vai solun ulkokalvolla. Menetelmän täytyisi olla mahdollisimman hellävarainen, sillä liian kovakourainen käsittely voi denaturoida proteiinin, vapauttaa proteolyttisiä entsyymejä ja johtaa yleiseen happamoitumiseen. Käsittely täytyy

suorittaa myös nopeasti, jotta tuotteen pH, ionivoimat sekä stabiilius säilyisi. (Recombinant protein purification 2012: 14–15.) Käsiteltyä näytettä kirkastetaan puhtaammaksi sentrifugoinnilla ja suodatuksella. Tämä toimenpide saattaa vähentää puhdistusvaiheessa tarvittavien pesuvaiheiden määrä, eikä tuote tällöin tuki puhdistuksessa käytettävää pylvästä. (Recombinant protein purification 2012: 16–17.)

### 4.3 Puhdistus

Proteiineja puhdistetaan käyttämällä kromatografisia menetelmiä, joiden avulla ne voidaan erottaa toisistaan erilaisten ominaisuuksiensa perusteella. Puhdistus suoritetaan pylvään avulla. (Recombinant protein purification 2012: 5.) Kohdeproteiinien puhdistusta voidaan helpottaa liittämällä niihin *tag* eli fuusiopartneri, joka on proteiini tai peptidi (Suominen ym. 2013:88). Fuusiopartnerilla leimatut proteiinit puhdistetaan affiniteetikromatografialla. Histidiini -tag on tavallisin fuusiopartneri. (Recombinant protein purification 2012: 11.) Tässä opinnäytetyössä puhdistettiin histidiinimerkittyä proteiinia.

Histidiinimerkityillä proteiineilla on korkea selektiivinen affiniteetti sekä  $\text{Ni}^{2+}$  -ionille että monille muille metalli-ioneille, jotka voidaan immobilisoida kromatografisessa väliaineessa kelatoivien ligandien avulla. Histidiinimerkityt proteiinit sitoutuvat selektiivisesti varautuneeseen metalli-ioniväliaineeseen, joka koostuu agaroosihelmistä. Agaroosihelminä voidaan käyttää esimerkiksi nikkelisefaroosista koostuvia helmiä. Muut proteiinit, joita ei ole merkitty histidiinillä, tarttuvat pylvään väliaineeseen heikosti tai eivät ollenkaan. Tästä puhdistusmenetelmästä käytetään nimeä immobilisoitu metalli-oniaffiniteetikromatografia (IMAC). Mitä pitempi käytetty histidiini on, sitä vahvemmin se tarttuu väliaineeseen. (Recombinant protein purification. 2012: 27.)

Aluksi pylväs tasapainotetaan sitomispuskurilla (A), joka sisältää vähän imidatsolia. Seuraavaksi lisätään näyte, jossa ovat histidiinimerkityt proteiinit sitoutuvat ligandiin. Ligandiin sitoutumaton materiaali pestään pois samalla sitomispuskurilla niin kauan, että absorbanssi saavuttaa lähtötilanteen. Pesun jälkeen imidatsolin konsentraatiota nostetaan käyttämällä eluutiopuskuria (B), jotta proteiinit irtoaisivat väliaineesta. Eluutio voidaan suorittaa käyttämällä joko porrastettua tai lineaarista gradienttia. Eluution jälkeen pylvästä pestään vielä sitomispuskurilla eli tasapainotetaan pylväs lähtötilanteeseen. (Recombinant protein purification. 2012: 27–37.)

Imidatsolin tarkoitus on kilpailla proteiinien kanssa varautuneeseen metallioniväliaineeseen sitoutumisesta. Tasapainotuspuskuriin ja näytteeseen lisätään pieni määrä imidatsolia epäspesifisen sitoutumisen vähentämiseksi. Suuri määrä imidatsolia voi myös vähentää histidiinimerkittyjen proteiinien sitoutumista. Tämän takia imidatsolin konsentraatio tulee optimoida, jotta lopputuote olisi puhdasta ja saataisiin mahdollisimman suuri määrä merkittyjä proteiineja. (Recombinant protein purification. 2012: 31.)

#### 4.3.1 ÄKTA prime plus -laite

ÄKTA prime plus on kromatografialaitteisto, jota käytetään proteiinien puhdistamiseen (Protein purification - at the touch of a button. 2008). Pylväässä tapahtuu proteiinien erotus, jonka etenemistä seurataan erilaisten tunnistimien avulla. Suurin osa proteiineista voidaan havaita mittaamalla näytteen absorbanssia aallonpituudella 280 nm. Muitakin ultraviolettialueen aallonpituuksia on kuitenkin mahdollista käyttää. Johtokyvyn mittaamista käytetään suolakonsentraation muutosten ja pylvään tasapainotuksen seuraamiseen. Puhdistuksen jälkeen eluoitunut materiaali kerätään fraktionkerääjällä suoraan putkiin. Fraktioiden koko määritellään kyseiseen puhdistukseen sopivaksi. (ÄKTA Laboratory-scale Chromatography Systems. 2015.)

#### 4.4 SDS-PAGE

SDS-PAGE on elektroforeettinen menetelmä, jonka avulla voidaan erotella proteiineja niiden molekyylipainon perusteella. Testi suoritetaan polyakryyliamidigeelillä. (2-D Electrophoresis 2010: 72.) Elektroforeesi tehdään yleensä denaturoivissa olosuhteissa detergenttinä olevan natriumdodekyylisulfaatin (SDS) läsnäollessa. SDS kiinnittyy proteiiniin antaen sille voimakkaan negatiivisen varauksen, joka mahdollistaa proteiinin kulkemisen geelissä. (Janeway ym. 2001: 632.) Detergentin tarkoitus on tuhota proteiinien kvaternääri- ja tertiäärirakenteet. Sen avulla varmistetaan, että proteiinit ovat eroteltu pelkästään koon, eikä niiden kolmiulotteisen rakenteen mukaan. Näytteisiin lisätään SDS:n mukana myös väriainetta, jotta ne on helpompi lisätä kaivoihin ja niiden etenemistä geelissä pystyy seuraamaan elektroforeesin aikana. (Western Blotting 2014: 27–32.) Elektroforeesissa proteiinia sisältävä näyte ajautuu geeliin jännitteen avulla. Geeli asetetaan kammioon, jossa molemmilla kohtioilla on puskuriliuskat. Molekyylit kulkevat katodilta anodille eli negatiivisesti varautuneesta kohtiosta positiivisesti

varautunutta kohtiota kohti. Elektroforeesissa isommat proteiinit kulkevat hitaammin geeliä pitkin kuin pienemmät. Näin ollen erotuksen lopussa proteiinit voidaan värjäyksen jälkeen havaita raitoina geelin eri kohdissa. (Western Blotting 2014: 27–32, 39.)

#### 4.5 Vasta-aineiden tuottaminen puhdistetulla antigeenillä

Puhdistettua antigeeniä voidaan käyttää monoklonaalisten vasta-aineiden tuottoon. Elimistössä syntyy immuunijärjestelmän tuottamana vasta-aineita tiettyjä antigeenejä, kuten viruksen pintaproteiineja vastaan, ja nämä vasta-aineet kiinnittyvät tiettyyn kohtaan viruksen pintaproteiineja. (Happonen ym. 2013:150–151.) Tällaisia eläinten immuunijärjestelmän tuottamia vasta-aineita voidaan hyödyntää tutkimuskäytössä ja diagnostiikassa erilaisten kiinnostuksen kohteena olevien molekyylien löytämiseen (Antibody Production and Purification Technical Handbook. 2010). Monoklonaaliset vasta-aineet ovat bioteknisesti valmistettuja samanlaisia kuin elimistössä syntyvät vasta-aineet, ja nekin kiinnittyvät tarkasti vain yhteen tiettyyn kohtaan antigeeniä. Nämä vasta-aineet tunnistavat siis tarkkaan elimistöön tunkeutuneet mikrobit tai vieraat solut ja niiden sisältämän spesifisen antigeenin. (Happonen ym. 2013:150–151.)

Monoklonaalisia vasta-aineita on tuotettu 1980-luvulta lähtien hybridoomasoluilla (Aittomäki 2006:93–105). Vuonna 1975 tehdyssä tutkimuksessa Köhler ja Milstein osoittivat, että hybridoomasoluja voidaan kasvattaa suuria määriä kasvustoilla spesifistä vasta-ainetuotantoa varten. He arvioivat tuolloin tämän olevan arvokasta lääketieteelle ja teollisuudelle. (Köhler, Milstein 1975.) Ensimmäinen raportoitu onnistunut lääkehoito, jossa käytettiin monoklonaalisia vasta-aineita, annettiin vuonna 1982 B-solulymfomapotilaille (Waldmann 2003).

Monoklonaalisia vasta-aineita voidaan tuottaa muun muassa siten, että hiireen injektoidaan puhdistettua antigeeniä, minkä jälkeen hiiressä alkaa muodostua erilaisia B-plasmasoluja, jotka alkavat tuottaa vasta-aineita. B-solut eristetään hiirestä ja ne fuusoidaan eli yhdistetään myeloomasolujen kanssa. (Happonen ym. 2013:150.) B-soluilla sellaisenaan on vain rajattu elinikä. Tämän takia solut yhdistetään myeloomasoluihin, jotka ovat lähes kuolemattomia. (Antibody Production and Purification Technical Handbook. 2010.) Fuusio- eli hybridoomasoluja kasvatetaan soluviljelmässä, jossa solut tuottavat erilaisia vasta-aineita. Tästä soluviljelmästä otetaan talteen vain haluttua vasta-ainetta tuottavat solut ja niitä jatkoviljellään uudella viljelmällä. Lopuksi solujen

tuottamat monoklonaaliset vasta-aineet eristetään soluviljelmästä haluttua käyttöä varten. (Happonen ym. 2013:150.)

## 5 Diagnostisen testin kehittäminen

### 5.1 ELISA-menetelmän periaatteet

ELISA-menetelmä on entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys, jossa antigeenit sitoutuvat niille spesifisiin vasta-aineisiin tai toisinpäin (Janeway 2001:619–620). ELISA-menetelmällä voidaan tutkia pieniäkin määriä nestemäisen näytteen sisältämiä antigeenejä kuten proteiineja, peptidejä ja hormoneja tai vasta-aineita (Gan - Patel 2013). ELISA -menetelmästä on kehitetty erilaisia variaatioita, mutta kaikki perustuvat samoihin peruselementteihin. Tyypillisessä ELISA-menetelmässä tutkittavat antigeenit tehdään liikuntakyvyttömäksi. Ne kiinnitetään suoraan esimerkiksi polystyreenistä tehdyn kuoppalevyn kaivon pohjalle tai epäsuorasti käyttämällä apuna Sandwich-ELISA -menetelmää. Tämän jälkeen antigeenit voidaan havaita käyttämällä apuna entsyymi- leimattua primäärivasta-ainetta (suora menetelmä) tai leimaamattoman primäärivasta-aineen sekä leimatun sekundäärivasta-aineen yhdistelmää (epäsuora menetelmä). (Thermo Scientific 2010: 2-6; Overview of ELISA. 2015.) Suora testi on yleisesti nopeampi kuin epäsuora. Suorassa testissä eliminoiduu potentiaalinen taustasignaali, joka aiheutuu kun sekundäärivasta-aine ristireagoi primäärivasta-aineen kanssa. Toisaalta testi on yleisesti vähemmän sensitiivinen kuin epäsuora ja sen käyttömahdollisuus on parhaita silloin, kun haluttua antigeeniä on runsaasti. (Thermo Scientific 2010: 2-3.)

Suorassa ELISA-testissä antigeeni kiinnitetään suoraan kaivon pohjalle, josta se voidaan löytää leimatun primäärivasta-aineen avulla. Leimana voidaan käyttää entsyymiä tai muuta vaihtoehtoista signaalimolekyyliä, kuten fluorokromia. Vasta-aineessa olevan leiman avulla voidaan mitata liikuntakyvyttömän antigeenin pitoisuutta. Yleinen entsyymileima on pienikokoinen HRP-entsyymi, joka voidaan liittää vasta-aineeseen. Epäsuora ELISA-testi vaatii ylimääräisen vaiheen. Kuoppalevylle lisätyt antigeenit voidaan löytää spesifisen primäärivasta-aineen avulla. Tämän jälkeen leimattu sekundäärivasta-aine kiinnittyy spesifisti primäärivasta-aineeseen, minkä seurauksena näytteessä olevan antigeenin määrä voidaan mitata. Käytettäessä fluorokromileimaa, signaali mi-



tataan esimerkiksi fluorometrilla. (Thermo Scientific 2010: 2-3, 11; Overview of ELISA. 2015.)

Sandwich- eli kerros-ELISA:ssa kuoppalevyn pohja päällystetään vasta-aineilla, jotka tunnistavat mitattavan antigeenin ja tekevät näytteessä olevan antigeenin liikuntakyvyttömäksi inkubaation aikana. Tämä ELISA-testi sopii erityisesti näytteille, jotka sisältävät runsaasti erilaisia proteiineja ja spesifisten vasta-aineiden ansiosta saadaan määritettyä vain halutun proteiinin pitoisuus. Kerros-ELISA-menetelmään tarvitaan kaksi vasta-ainetta, jotka tarttuvat spesifisesti antigeeniin. Kumpikin vasta-aineista sitoutuu antigeenin eri kohdan, eli epitoopin, kanssa. Ensimmäinen vasta-aine, pinnoitusvasta-aine, kiinnitetään kuoppalevyyn. Tämän jälkeen levy estetään eli levyn päällystämättömät osat päällystetään merkityksettömällä proteiinilla tai molekyylillä. Estopuskurin tarkoitus on estää epäspesifisten proteiinien tarttuminen kuoppalevyille. Optimaalinen puskuri ei reagoi yksinään vasta-aineiden tai kohdeproteiinin kanssa. Eston jälkeen lisätään näyte ja näytteessä oleva antigeeni sitoutuu tähän kuoppalevyn pohjaan sidottuun vasta-aineeseen. Muut proteiinit pestään pois ja lisätään toinen vasta-aine, eli primäärivasta-aine, joka on leimattu signaalivälitteisellä entsyymillä. Primäärivasta-aine havaitsee antigeenin ja tarttuu siihen. Molempien vasta-aineiden täytyy toimia yhdessä, mutta ne eivät saa kilpailla keskenään antigeeniin tarttumisesta eli samasta epitoopista. Kuoppalevyä pestään eri vaiheiden välissä, jotta tarttumaton aine saadaan pois ja vain spesifistä tarttumista tapahtuu. Jotta primäärivasta-aineeseen leimattu entsyymi voidaan havaita, täytyy lisätä substraattia vasta-aine-antigeenikompleksiin. Substraatin lisäys kuoppalevyyn aiheuttaa värireaktion, jonka intensiteetti on suoraan verrannollinen näytteessä olevan antigeenin pitoisuuteen. Värin intensiteetti mitataan spektrofotometrilla. (Janeway 2001: 619–620; Thermo Scientific 2010: 2-6.)

Spesifisen ELISA-testin kehittäminen ja optimointi voi olla vaikeaa. Testin pystyttämisen vaatii erilaisia komponentteja, joten tuloksen saaminen voi epäonnistua johtuen useista eri tekijöistä, kuten vasta-aineista, puskureista, käytetyistä leimoista ja substraateista. ELISA-testin pystyttämisessä onkin tärkeintä ensin määrittää oikeat vasta-aineet, jotka toimivat yhdessä. Jotta tulokset olisivat virheettömiä, sekä primääri- että sekundäärivasta-aineet tulisi validoida siten, että ne toimivat parina, eivätkä kilpaile keskenään antigeeniin sitoutumisesta. Tärkeää on myös kehittää ja optimoida standardikuvaaja kiinnostuksen kohteena olevalle aineelle ennen näytteiden analysointia. Jos standardikuvaaja näyttää oikeaa erottelukykä, mittausaluetta ja on lineaarinen, voidaan kehitysprosessia jatkaa. Yksi keskeisimmistä asioista testin kehittämisessä on

entsyymikonjugaatin, eli leiman, konsentraation optimointi. Sitoutuneen konjugaatin määrä vaikuttaa siihen, miten vahva signaali lopulta muodostuu. Kun ELISA-testin kehitysvaiheessa mitataan näytteestä antigeeniä, täytyy näytematriisiin vaikutukset kontrolloida suorittamalla Matrix Spiking-menetelmä. (Thermo Scientific 2010: 2–6.)

## 5.2 Matrix Spiking-menetelmän periaatteet

Matrix Spiking on menetelmä, jolla voidaan arvioida analyttisen testin toimintaa potilasnäytteitä vastaavalla näytematriisilla. Näin voidaan arvioida antaako koemenetelmä valideja tuloksia testattaessa näytettä. Käytännössä Matrix Spiking suoritetaan lisäämällä tunnettu konsentraatio ja määrä analyttia, kuten antigeenia, näytteeseen. Näyte mitataan sekä määritetään saadaanko näytteen konsentraatiotulokseksi sama kuin lisätyn analyttin tunnettu konsentraatio. Yleensä menetelmässä tehdään analyttistä monta eri pitoisuuspistettä, jolloin varmistetaan matriisivaikutus laajalla mittausalueella, mutta analyttin määrä ei saisi lisätä näytteen tilavuutta enempää kuin 5 %. (Thermo Fisher Scientific 2011.)

Opinnäytetyössä käytetyt potilasnäytteet voivat sisältää testin tulokseen vaikuttavia epäpuhtauksia. Näytteen komponentit reagoivat kiinnostuksen kohteena olevan proteiinin kanssa antaen epäluotettavia tuloksia. Tätä niin sanottua matriisivaikutusta tutkittiin potilasnäytteiden kaltaisilla, kohdeproteiinilla spaikatuilla näytteillä, joihin on lisätty tutkittavaa antigeenia eli kohdeproteiinia. Näin varmistetaan eri kohdeproteiinipitoisuuksilla testin lineaarinen toiminta halutulle pitoisuusalueelle ja varmistetaan käytetyn näytematriisin toiminta ilman taustahäiriöitä. (Advansta 2015.) Tässä opinnäytetyössä testattiin Matrix Spiking:n avulla seerumi- ja plasmamatriiseja lisäämällä tunnettu määrä tutkittavaa kohdeproteiini-1:tä näytteisiin.

## 6 Käytännön toteutus ja menetelmät

### 6.1 Opinnäytetyön toteutus

Opinnäytetyön käytännön työvaihe suoritettiin kolmen viikon aikana tammikuussa 2016 Medix Biochemican tiloissa Espoossa ja sitä varten tehtiin tarkat aikataulusuunnitelmat ja työohjeet. Työt aikataulutettiin niin, että ensimmäinen viikko tehtiin kohdeproteiini-2:n

puhdistamista ja loppuaika käytettiin IEMA-testin optimointiin. Työt jaettiin tasapuolisesti molempien tekijöiden kesken. Työelämässä toimi ohjaajana FT tutkimus- ja tuotekehityspäällikkö Juuso Juhila ja FL teknologiapäällikkö Minna Mattila, joka opasti laboratoriotöitä proteiinin puhdistusvaiheessa.

Opinnäytetyötä varten ei tarvittu hakea erillistä tutkimuslupaa työn tekijöiden osalta, sillä Medix Biochemicalla oli jo omat voimassa olevat tutkimusluvut. Opinnäytetyötä varten allekirjoitettiin Medix Biochemican kanssa salassapitosopimus, sillä kumppanuus-diagnostiikkaprojektiin liittyi tietoja, joita ei ollut vielä julkaistu yrityksen ulkopuolelle opinnäytetyön aikana. Sopimus velvoittaa, ettei tässä raportissa kerrota yksityiskohdaisia tietoja liittyen kumppanuus-diagnostiikkaprojektiin tai projektin mielenkiinnon kohteina olevien proteiinien nimiä. Hyväksytyn tutkimussuunnitelman jälkeen työtä varten allekirjoitettiin Metropolian, Medix Biochemican ja tekijöiden välinen opinnäytetyön yhteistyösopimus.

## 6.2 Kohdeproteiini-2:n puhdistus

Kohdeproteiini-2 oli hyönteissoluviljelmässä tuotettu rekombinanttiantigeeni, jossa oli kiinni histidiiniketju. Puhdistettavaa näytettä oli alun perin yhteensä noin 6 ml ja anti-geenin arvioitu pitoisuus oli 0,88 mg/ml. Puhdistus suoritettiin kaksi kertaa kahtena eri päivänä käyttämällä ÄKTAprime plus -laitteelle asennettua ohjelmaa, jonka kesto oli noin 1 h 10 min. Pylväänä käytettiin GE Healthcare:n valmiiksi pakattua 1 ml HisTrap HP-pylvästä. Puskureina käytettiin kahta eri natriumfosfaattipuskuria, joihin lisättiin tietty määrä imidatsolia. Eluutiopuskurissa (B) imidatsolin määrä oli korkeampi kuin sitoutumispuskurissa (A). Puhdistusprosessiin kuuluivat pylvääntasapainotus A-puskurilla, näytteensyöttö, pesu A-puskurilla, B-puskurin lineaarinen gradientti 0 %:sta 100 %. Tämä tarkoittaa sitä, että näytteensyötön ja pesun jälkeen pylvästä eluoidaan niin, että puskurin määrästä eluoinnin alussa on A-puskuria 100 %. Eluointia jatketaan niin, että B-puskuria lisätään vähitellen kunnes lopussa sitä on 100 %.

Puhdistus aloitettiin näytteen suodattamisella, jolloin huomattiin sen vaahtoavan huomattavasti. Tämä toi osaltaan haasteita, sillä vaahtoa ei saisi päästä puhdistuslaitteeseen. Suodatuksen jälkeen puhdistettiin 1,3 ml näytettä. Puhdistuksesta saaduista fraktioista mitattiin niiden absorbanssi ja osalle fraktioista tehtiin SDS-PAGE. Tällä yritettiin varmistaa näytteen puhtaus ja tutkittiin, löytyykö näytteistä puhdistettua proteiinia.

Ensimmäisen puhdistuksen eluutiokäyrässä huomattiin olevan kaksi loivaa huippua, joten näiden huippujen sisältämien fraktioiden absorbanssi mitattiin spektrofotometrillä. (Liite 1). Ne fraktiot, joiden absorbanssi oli yli 0.010, yhdistettiin pooliksi. Ensimmäisestä puhdistuksesta tehtiin yhteensä kaksi poolia, molemmista huipuista omansa. Tämän jälkeen poolit dialysoitiin eli tehtiin puskurinvaihdos dialyysipuskuriin.

Ensimmäisessä puhdistuksessa eluutiokäyrän huiput eivät olleet terävinä piikkeinä, vaan ne ilmenivät vain loivana nousuna. Tämän takia toista puhdistusta jouduttiin optimoimaan, jotta saataisiin selvempi eluutiopiikki ja täten enemmän lopputuotetta. Toinen puhdistus suoritettiin samalla tavalla kuin ensimmäinen, ainoastaan eluutiopuskurin imidatsolipitoisuutta laskettiin. Toisessa puhdistuksessa näytettä puhdistettiin 1,4 ml. Myös toisesta puhdistuksesta saaduista fragmenteista osa eroteltiin SDS-PAGE:lla samalla tavalla kuin ensimmäisessä puhdistuksessa.

Myös toisen puhdistuksen eluutiokäyrässä huomattiin olevan kaksi loivaa huippua, joten näiden huippujen sisältämien fraktioiden absorbanssi mitattiin spektrofotometrillä. (Liite 2). Ne fraktiot, joiden absorbanssi oli yli 0.010, yhdistettiin pooliksi. Toisesta puhdistuksesta tehtiin yhteensä kaksi poolia, molemmista huipuista omansa.. Tämän jälkeen poolit dialysoitiin eli tehtiin puskurinvaihdos dialyysipuskuriin.

#### 6.2.1 Näytteiden erottelu SDS-PAGE:lla

SDS-PAGE:n valittiin fraktiot, jotka olivat eluutiohuipulla. Kummastakin huipusta valikoitiin kuusi fraktiota tasaisin välipistein, jotta saataisiin kokonaiskuva eluutiohuipusta. Ensimmäinen SDS-PAGE -ajo epäonnistui, sillä näytteet eivät ajautuneet geelillä halutulla tavalla, minkä seurauksena SDS-PAGE -ajo uusittiin. Valikoiduista fraktioista pipetoitiin elektroforeesia varten näytteet, jotka laimennettiin SDS-näytepuskurilla suhteessa 1:5. Tämän jälkeen näytteet kuumennettiin 95 °C lämpöblokkissa viiden minuutin ajan. Kummastakin puhdistuksesta eroteltiin 12 näytettä käyttämällä kahta geeliä. Elektroforeesin jälkeen geelit värjättiin Coomassie Blue -värillä ja niiden annettiin kuivua yön yli.

### 6.3 IEMA-testin kehittäminen ja optimointi kohdeproteiini-1:tä varten

IEMA-testin kehittäminen ja optimointi suoritettiin kahden erillisen osatyön avulla, joista kumpikin noudatti ELISA-menetelmän periaatteita. Molemmassa osatyössä hyödynnettiin kohdeproteiini-1:n antigeeniä ja sen avulla tuotettuja vasta-aineita. Kohdeproteiini-1 oli hyönteissoluviljelmässä tuotettu rekombinantiantigeeni, jonka Medix Biochemica oli tuottanut yhteistyön kautta. Ennen opinnäytetyön alkua proteiini-1 oli puhdistettu ja vasta-aineet oli tuotettu aikaisemman yhteistyön aikana. Sekä puhdistettua antigeeniä ja tuotettuja vasta-aineita pystyttiin hyödyntämään diagnostisen IEMA-testin kehittämisessä ja optimoinnissa, joka nopeutti huomattavasti diagnostisen testin pystyttämistä.

#### 6.3.1 Osatyö 1: Matriisivaikutuksen selvittäminen IEMA-testin toimintaan

Osatyön 1 tarkoituksena oli verrata seerumi- ja plasmamatriisien toimintaa kohdeproteiini-1:n läsnä ollessa naisen ja miehen näytteissä joka mahdollisti myös sukupuolen välisten erojen selvittämisen. Aikaisemmassa Medix Biochemican testauksessa tälle kohdeproteiini-1:lle oli huomattu näytemateriaalien vaikuttavan häiritsevästi IEMA-testin luotettavuuteen. Tämä ilmeni erityisesti laimentamattomilla seerumi- ja plasmanäytteillä, joihin oli lisätty kohdeproteiini-1:tä viidellä eri tunnetulla pitoisuudella. Testin tuloksista saatiin selville, että seerumi ja plasma laimentamattomina sisälsivät liikaa häiritseviä tekijöitä. Matriisivaikutus vaikutti tulosten luotettavuuteen ja antoi vääriä pitoisuuksia verrattuna laskennalliseen pitoisuuteen. Aiemman testauksen perusteella osatyötä 1 varten päätettiin laimentaa näytteet näytepuskurilla ja etsiä sopiva laimennossuhde, jolla näytemateriaali ei vaikuta häiritsevästi testin toimintaan.

Osatyö 1 suoritettiin noudattaen ELISA-menetelmän periaatteella ja se oli kaksipäiväinen. Ensimmäisenä päivänä tyhjä 96-kuoppalevy pinnoitettiin kohdeproteiini-1:n avulla tuotetuilla vasta-aineilla. Ennen pinnoitusta vasta-aineet laimennettiin tarkkaan pitoisuuteen, jonka Medix Biochemica oli jo aiemmissa tutkimuksissaan määrittänyt sopivaksi pinnoituspitoisuudeksi. Levyä inkuboitiin yön yli +4 °C:ssa ja seuraavana päivänä levyille lisättiin estoliuosta.

Toisena työpäivänä kerättiin tarvittavat näytemateriaalit. Verinäytteet otettiin kahdelta Medix Biochemican työntekijältä. Näytteenotossa noudatettiin näytteenoton yleisiä periaatteita ja verikoe otettiin laskimosta vakuumiteknikalla (Tuokko - Rautajoki - Lehto 2009:37–48.) Näytemateriaaleja otettiin kaksi erilaista eli plasma ja seerumi. Verinäyt-

teet otettiin hepariini- ja seerumiputkiin, joista jokaista kaksi putkea molemmilta näytteenantajilta. Toiselta antajalta otettiin myös verta kahteen EDTA-putkeen. Kaikki näytteet olivat paastoverinäytteitä. Yhteensä verinäyteputkia kerättiin 10 kappaletta. Näyteputket sentrifugoitiin 2600 RPM kierrosnopeudella kymmenen minuutin ajan.

Plasma- ja seeruminäytteet eroteltiin näytteenottoputkista ja niistä tehtiin laimennokset näytepuskuriin suhteilla 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, joissa suurempi tilavuus oli puskuria. Laimennettuihin seerumi- ja plasmanäytteisiin lisättiin kohdeproteiini-1:stä neljällä eri pitoisuudella 0, 3.7, 11.1 ja 33.3 ng/ml. Testiä varten valmistettiin myös standardikuvaaja laimentamalla kohdeproteiini-1 tiettyihin aikaisemmin määritettyihin pitoisuuksiin 0, 1.2, 3.7, 11.1, 33.3, 100 ja 300 ng/ml. Testin viimeisessä vaiheessa kuoppalevyyn lisättiin HRP-konjugaattia. Lopuksi näytteen absorbanssi mitattiin spektrofotometrillä, josta saatiin selville näytteen sisältämän kohdeproteiini-1:n konsentraatio.

### 6.3.2 Osatyö 2: Lääkeaineen vaikutuksen selvittäminen IEMA-testin toimintaan

Osatyön 2 tarkoituksena oli tutkia IEMA-testin toimintaa endometrioosin hoitoon suunnitellun lääkeaineen läsnä ollessa. Osatyöhön 2 käytettiin ainoastaan naisen seeruminäytteitä laimennossuhteella 1:8, joka oli valittu parhaiten toimivaksi edellisessä osatyössä. Lääkeainetta liuotettiin 2,13 mg:aa 425 µl:aan dimetyylisulfoksidia (DMSO) kumppanilääkeyhtiön ohjeistuksen mukaan, jolloin kantaliuoksen pitoisuudeksi saatiin 10 mM. Tästä kantaliuoksesta tehtiin jatkolaimennoksia kolmeen eri loppupitoisuuteen. Testausta varten tyhjä 96-kuoppalevy pinnoitettiin kohdeproteiini-1:n avulla tuotetuilla vasta-aineilla. Kuoppalevyyn annettiin inkuboitua yön yli +4 °C:ssa, jonka jälkeen levyille lisättiin estoliuos.

Näytemateriaalina käytettiin tuoretta naisen seerumia, johon lisättiin kohdeproteiini-1:tä viidellä eri pitoisuudella: 0, 3.7, 11.1, 33,3 ja 100 ng/ml. Jokainen spaikattu näyte jaettiin viiteen eri putkeen ja näin ollen saatiin yhteensä 25 näytettä. Jokaiseen eri seerumin spiking -pitoisuuteen lisättiin kolmea eri lääkeainepitoisuutta, mistä saatiin lääkkeen loppupitoisuudeksi seerumissa 10, 50 ja 100 nM. Näiden lisäksi näytteisiin lisättiin negatiivisena kontrollina myös laboratoriovettä ja laimennettua DMSO:a. Lisäksi testauksissa kontrolloitiin DMSO:n vaikutusta testin toimintaan lisäämällä laimennettua DMSO:a standardikuvaajaan vastaavana pitoisuutena kuin se oli lopullisissa spaikaissa näytteissä. Standardikuvaajan pitoisuudet olivat 0, 1.2, 3.7, 11.1, 33.3, 100 ja

300 ng/ml. Antigeenin, lääkeaineen, veden ja DMSO:n lisäyksen jälkeen seerumeita inkuboitiin +35 °C:ssa 10 minuutin ajan, jonka jälkeen näytteet laimennettiin 1:8 näytekupurilla. Testin viimeisessä vaiheessa lisättiin HRP-konjugaattia ja lopuksi näytteiden absorbanssi mitattiin spektrofotometrillä.

## 7 Tulokset

### 7.1 Kohdeproteiini-2:n puhdistus

Kummastakin puhdistuksesta tehtiin SDS-PAGE osalle fraktioista, mutta geeleille ei kuitenkaan muodostunut ollenkaan vyöhykkeitä näytteistä (Liite 3). Kummankin puhdistuksen pooleista mitattiin absorbanssi spektrofotometrillä. Absorbanssin ja korjauskerroimen avulla laskettiin kvantitatiivinen proteiinimäärä pooleista. Korjauskerroin oli laskettu proteiinin aminohapporakenteen avulla.

Ensimmäisestä puhdistuksesta saatiin lopputuotetta poolauksen ja dialysoinnin jälkeen ensimmäisestä poolista 3.9 ml ja toisesta poolista 3.1 ml. Ensimmäisestä poolista saatiin lopputuotteen määräksi 0,0363 mg ja toisesta poolista 0,0268 mg. Yhteensä ensimmäisestä puhdistuksesta lopputuotetta saatiin 7 ml ja 0,063 mg eli pitoisuudeksi saatiin 0,009 mg/ml. (Taulukko 1.)

Toisesta puhdistuksesta lopputuotetta saatiin ensimmäisessä poolissa 5.2 ml ja toisessa 3.5 ml. Toisen puhdistuksen lopputuotemääräksi saatiin ensimmäisestä poolista 0,076 mg ja toisesta poolista 0,03 mg. Yhteensä toisesta puhdistuksesta lopputuotetta saatiin 8,7 ml ja 0,106 mg eli pitoisuudeksi saatiin 0,012 mg/ml. (Taulukko 1.)

Taulukko 1. Proteiinin puhdistuksesta saadut numeeriset tulokset

	Ensimmäinen puhdistus	Toinen puhdistus
<b>Määrä (V)</b>	7 ml	8,7 ml
<b>Määrä (m)</b>	0,063 mg	0,106 mg
<b>Pitoisuus</b>	0,009 mg/ml	0,012 mg/ml

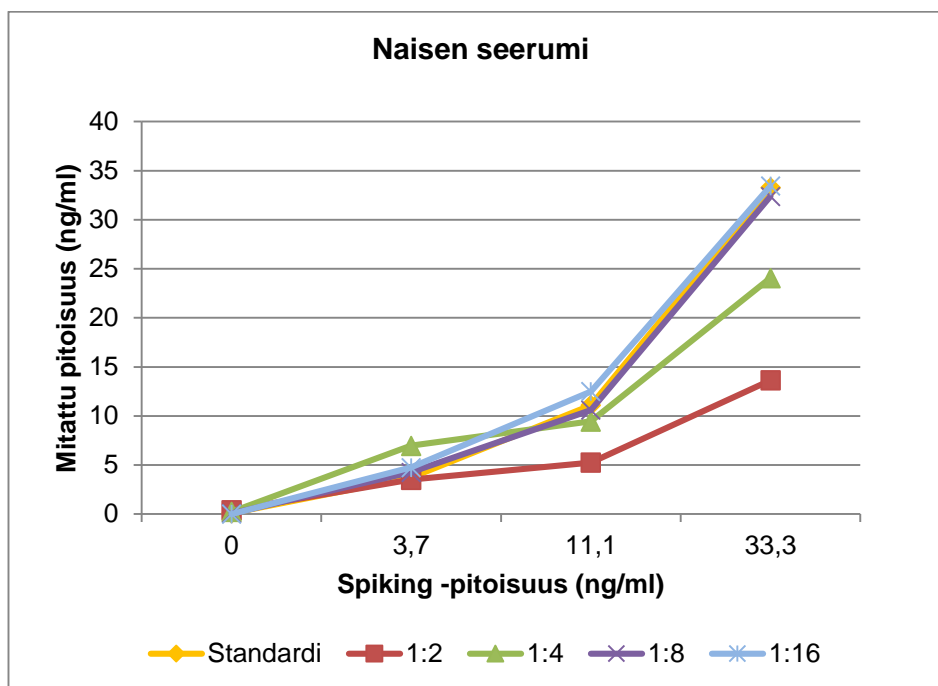
## 7.2 IEMA-testin optimointi

### 7.2.1 Osatyö 1: Matriisivaikutuksen selvittäminen IEMA-testin toimintaan

IEMA-testin optimoinnissa saadut numeeriset tulokset ovat käsitelty Excel – taulukko-laskentaohjelmalla. Seuraavissa kuvaajissa (Kuvio 1-7) on havainnollistettu osatyöstä 1 saatuja tuloksia. Tulokset ovat pitoisuudessa ng/ml. Tulosten perusteella on laadittu kuvaaja jokaiselle laimennussuhteelle ja tätä kuvaajaa on vertailtu standardikuvaajaan. Jokaiselle tulokselle on laskettu saantoprosentti, joka kertoo kuinka paljon on saavutettu halutusta tavoitepitoisuudesta (Taulukko 2-3, 5-7). Mitä lähempänä saantoprosentti on 100 %, sitä lähempänä tulos on oikeaa lisättyä pitoisuutta. Jos saanto on yli 100 %, näytteen konsentraatiotulos on korkeampi kuin oikea lisätty konsentraatio. Vastaavasti jos saanto on alle 100 %, näytteen konsentraatiotulos on alempi kuin oikea lisätty konsentraatio Taulukoissa oleva spiking-pitoisuus tarkoittaa lisättyä antigeenipitoisuutta, jota mitattavien tulosten tulisi vastata.

Kuviossa 1 on vertailtu naisen seeruminäytteitä laimennussuhteilla 1:2, 1:4, 1:8 ja 1:16. Kuvioista 1 ja taulukosta 2 nähdään, että laimennussuhteet 1:2 ja 1:4 antavat huonompia tuloksia, kuin laimennussuhteet 1:8 ja 1:16. Käytetyistä laimennussuhteista 1:8 on yhtäläisin standardikuvaajan kanssa. Laimennuksella 1:2 saantoprosentit asettuvat välille 41-139 % ja 1:4 laimennuksella 72-188 % välille. Kuvioista katsottuna näillä laimennuksilla saadut tulokset eroavat merkittävästi verrattuna 1:8 ja 1:16 laimennuksilla saatuihin tuloksiin. Laimennuksien 1:8 ja 1:16 saantoprosentit ovat hyvät, sillä ne ovat hyvin lähellä 100 %. Laimennuksella 1:8 saantoprosentit ovat välillä 95-115 % ja 1:16 100 - 128%. Saantoprosentit kertovat, kuinka monta prosenttia mitattu tulos eroaa taulukossa olevasta spiking -pitoisuudesta. (Kuvio 1, Taulukko 2.)



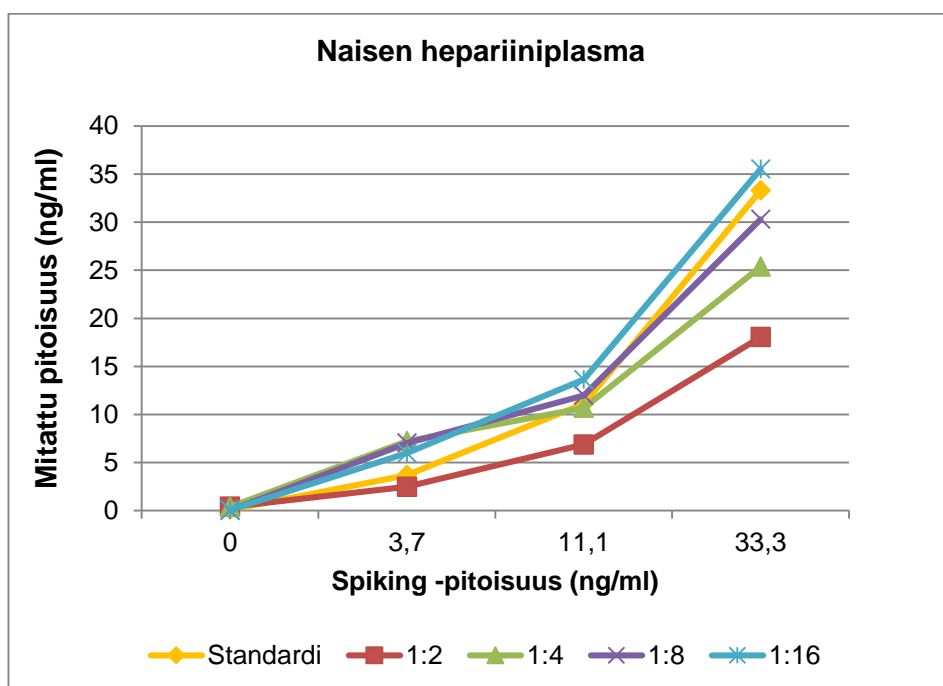


Kuvio 1. Naisen seeruminäytteet neljällä eri spiking – pitoisuudella ja neljällä laimennoksella

Taulukko 2. Taulukossa on esitetty naisen seeruminäytteiden tulokset eri laimennossuhteilla ja spiking-pitoisuuksilla sekä tulosten saantoprosentit

Naisen seeruminäytteet								
Spiking ng/ml	1:2	%	1:4	%	1:8	%	1:16	%
0	0,39	139	0,23	123	0,06	106	0	100
3,7	3,5	95	6,96	188	4,26	115	4,74	128
11,1	5,26	47	9,44	85	10,6	95	12,49	113
33,3	13,64	41	24,07	72	32,39	97	33,44	100

Kuviossa 2 on vertailtu naisen hepariiniplasmanäytteitä laimennussuhteilla 1:2, 1:4, 1:8 ja 1:16. Kuviosta ja taulukosta nähdään, että tulokset ovat melko samanlaisia naisen seerumista mitattujen tulosten kanssa. Merkittävä ero standardikuvaajaan on laimennoksella 1:2, joka antaa liian alhaisia tuloksia saantoprosenttien vaihdellen 54-139 %. Spiking pitoisuudella 3,7 ng/ml hepariiniplasma antaa korkeita tuloksia kaikilla laimennoksilla paitsi 1:2. Kuvion ja taulukon numeerisien arvojen mukaan paras laimennussuhde on 1:8. Kuitenkin spiking-pitoisuudella 3,7 ng/ml tulos on huomattavasti korkea saantoprosentin ollessa 190 %. Tällä spiking-pitoisuudella myös laimennokset 1:4 ja 1:16 antoivat korkeita pitoisuuksia. (Kuvio 2, Taulukko 3.)

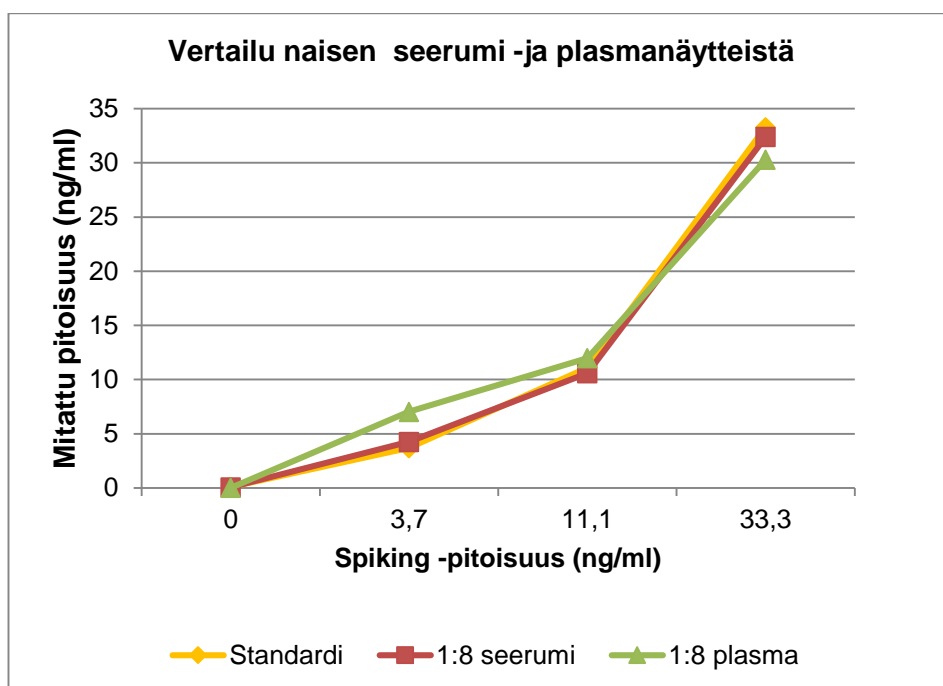


Kuvio 2. Naisen hepariiniplasma neljällä spiking – pitoisuudella ja neljällä laimennoksella

Taulukko 3. Taulukossa on esitetty naisen plasmanäytteiden tulokset eri laimennossuhteilla ja spiking -pitoisuuksilla sekä tulosten saantoprosentit

Naisen plasmanäytteet								
Spiking ng/ml	1:2	%	1:4	%	1:8	%	1:16	%
0	0,39	139	0,39	139	0,02	102	0,06	106
3,7	2,47	67	7,23	195	7,03	190	5,97	161
11,1	6,88	62	10,68	96	11,99	108	13,64	123
33,3	18,04	54	25,37	76	30,29	91	35,53	107

Kuviossa 3 on vertailtu keskenään naisen seerumi- ja plasmanäytteitä laimennossuhteella 1:8 ja taulukossa 4 on niiden numeeriset tulokset. Kuviosta nähdään, että 1:8 laimennoksella seerumi- ja hepariininäytteillä ei juurikaan ole eroa. Sekä seerumista että plasmasta mitatut tulokset ovat yhtäläisiä standardikuvaajan kanssa. Kuitenkin seerumi korreloi standardikuvaajan kanssa hieman paremmin pitoisuudella 3,7 ng/ml (Taulukko 4).

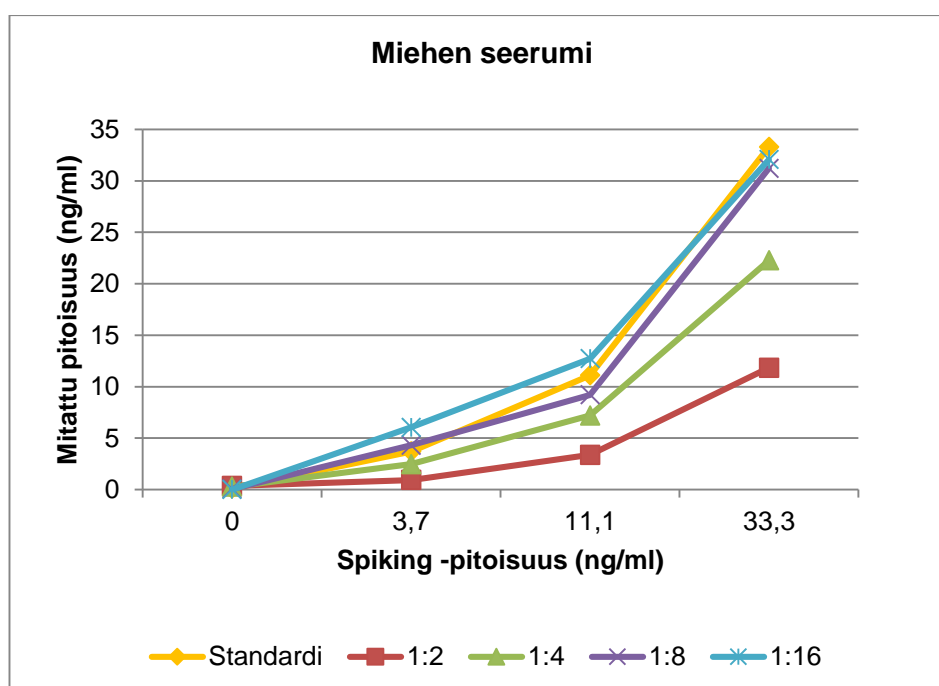


Kuvio 3. Vertailu naisen seerumi- ja plasmanäytteistä laimennoksella 1:8

Taulukko 4. Taulukossa naisen seerumin ja plasman numeeriset tulokset (ng/ml) laimennoksella 1:8.

Standardi	0,1	3,7	11,1	33,3
Spiking	0	3,7	11,1	33,3
1:8 seerumi	0,06	4,26	10,6	32,39
1:8 plasma	0,02	7,03	11,99	30,29

Kuvioissa 4 vertaillaan miehen seeruminäytteitä laimennossuhteilla 1:2, 1:4, 1:8 ja 1:16. Kuviosta ja taulukosta nähdään, että lähinnä standardikuvaajan arvoja ovat sekä laimennussuhde 1:8 että 1:16. Saantoprosentit ovat hyvät molemmilla laimennoksilla: 1:8 (83-116 %) ja 1:16 (100-164 %). Merkittävä ero standardikuvaajaan on laimennoksilla 1:2 ja 1:4. Saantoprosentit laimennoksella 1:2 ovat välillä 25-135 % ja 1:4 65-127 %. Kuviosta ja taulukosta nähdään että arvot ovat huomattavasti alhaisempia, kuin suuremmilla laimennospitoisuuksilla. Kuviosta nähdään, että testatuista laimennoksista 1:8 on standardikuvaajan kanssa yhtäläisin. (Kuvio 4, Taulukko 5.)

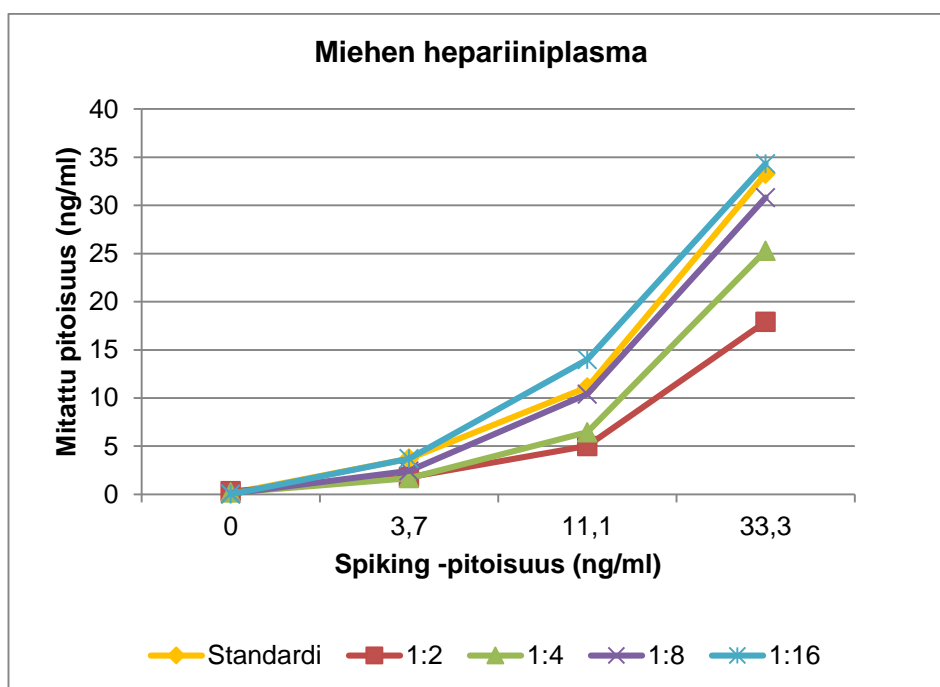


Kuvio 4. Miehen seerumi neljällä spiking –pitoisuudella ja neljällä laimennoksella

Taulukko 5. Taulukossa on esitetty miehen seeruminäytteiden tulokset eri laimennossuhteilla ja spiking -pitoisuuksilla sekä tulosten saantoprosentit

Miehen seeruminäytteet								
Spiking ng/ml	1:2	%	1:4	%	1:8	%	1:16	%
0	0,35	135	0,27	127	0,06	106	0	100
3,7	0,93	25	2,47	67	4,3	116	6,05	164
11,1	3,37	30	7,19	65	9,21	83	12,72	115
33,3	11,83	36	22,27	67	31,21	94	32,06	96

Kuviossa 5 vertaillaan miehen hepariiniplasmanäytteitä laimennossuhteilla 1:2, 1:4, 1:8 ja 1:16. Kuviosta nähdään, että laimennokset 1:2 ja 1:4 ovat antaneet alhaisempia tuloksia, kuin standardikuvaaja. Näiden laimennoksien saantoprosentit ovat välillä 24 - 131 % (1:2) ja 45 - 119 % (1:4). Taulukosta nähdään, että laimennoksien tulokset ovat merkittävästi liian alhaisia, eivätkä ole yhtäläisiä standardikuvaajan kanssa. Hepariiniplasmanäytteiden 1:16 laimennos antaa hieman korkeampia tuloksia. Saantoprosentit tällä laimennoksella ovat 100-126 % välillä. Kuitenkin suurimmalla pitoisuudella (33,3 ng/ml) 1:16 laimennos olisi lähempänä standardikuvaajaa kuin 1:8 laimennos (93 %), koska 1:16 laimennoksen saantoprosentti (103 %) on lähempänä sataa. Tämä ei kuitenkaan ole merkittävä ero, joten yhtäläisin standardikuvaajan kanssa on 1:8 laimennos, jonka saantoprosentit ovat 66-106 % välillä. (Kuvio 5, Taulukko 6.)

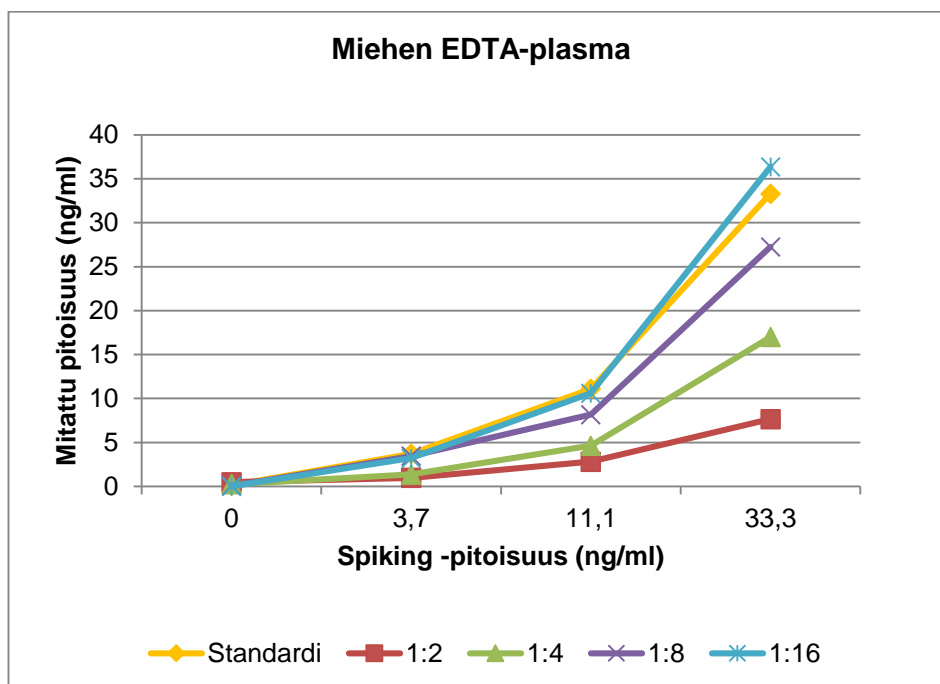


Kuvio 5. Miehen hepariiniplasma neljällä spiking – pitoisuudella ja neljällä laimennoksella

Taulukko 6. Taulukossa on esitetty miehen hepariiniplasmanäytteiden tulokset eri laimennossuhteilla ja spiking -pitoisuuksilla sekä tulosten saantoprosentit

Miehen hepariiniplasmanäytteet								
Spiking ng/ml	1:2	%	1:4	%	1:8	%	1:16	%
0	0,31	131	0,19	119	0,06	106	0,02	102
3,7	1,77	48	1,68	45	2,43	66	3,7	100
11,1	5,02	45	6,45	58	10,41	94	13,99	126
33,3	17,92	54	25,29	76	30,81	93	34,34	103

Kuviossa 6 vertaillaan miehen EDTA-plasmanäytteitä laimennossuhteilla 1:2, 1:4, 1:8 ja 1:16. Kuviosta nähdään, että laimennokset 1:2 ja 1:4 erot standardiin ovat merkittävät. Niiden saantoprosentit ovat 23-148 % (1:2) ja 36-123% (1:4) välillä. Laimennos 1:8 ei ole enää suuremmilla pitoisuuksilla yhtäläinen standardikuvaajan kanssa ja sen saantoprosentit ovat välillä 74-106 %. Kuvion ja taulukon perusteella EDTA-näytteille sopivin testatuista laimennussuhteista olisi 1:16, koska saantoprosentit ovat todella lähellä 100 % (87-109 %). (Kuvio 6, Taulukko 7.)

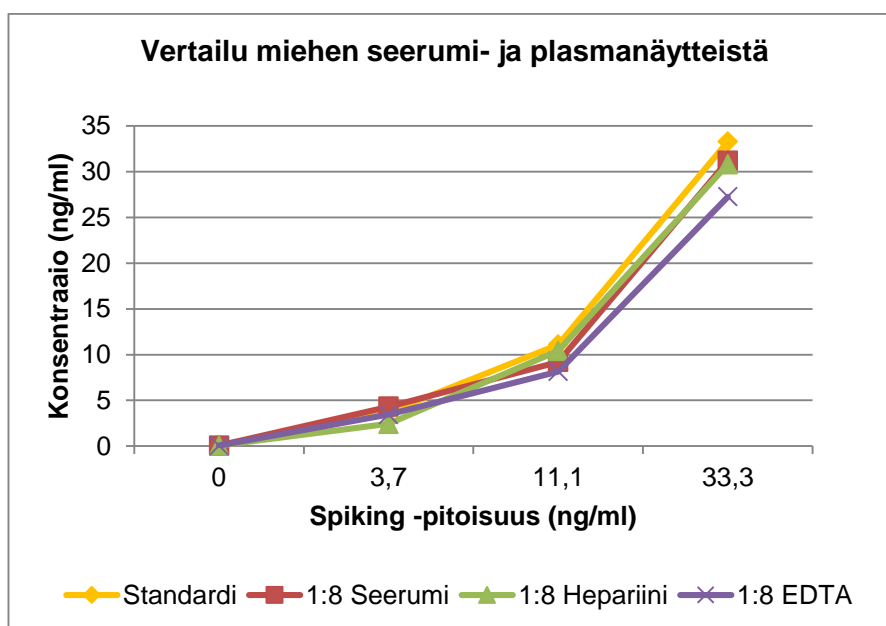


Kuvio 6. Miehen EDTA-plasma neljällä spiking -pitoisuudella ja neljällä laimennoksella

Taulukko 7. Taulukossa on esitetty miehen EDTA-plasmanäytteiden tulokset eri laimennossuhteilla ja spiking -pitoisuuksilla sekä tulosten saantoprosentit

Miehen EDTA-plasmanäytteet								
Spiking ng/ml	1:2	%	1:4	%	1:8	%	1:16	%
0	0,48	148	0,23	123	0,06	106	0	100
3,7	0,97	26	1,35	36	3,45	93	3,21	87
11,1	2,8	25	4,62	42	8,16	74	10,6	95
33,3	7,66	23	17	51	27,26	82	36,36	109

Kuviossa 7 on vertailtu keskenään miehen seerumi- ja plasmanäytteitä laimennossuhteella 1:8. Kuviosta nähdään, etteivät seerumin ja hepariiniplasman tulokset juurikaan eroa toisistaan ja ne ovat yhtäläiset standardikuvaajan kanssa. Taulukossa 8 on esitetty numeeriset tulokset, jotka tukevat tätä päätelmää. Mitatut arvot ovat yhtäläisiä spiking-pitoisuuksien kanssa. Spiking-pitoisuudella 11,1 ng/ml hepariiniplasma antaa parhaimman tulokset ja suurimmalla spiking-pitoisuudella seerumi antaa parhaimman tuloksen. EDTA-plasma poikkeaa eniten standardikuvaajasta ja kuviosta huomataan, että EDTA-plasmanäytteiden 1:8 laimennuksen tulokset ovat paljon alhaisempia kuin hepariiniplasman ja seerumin. Kuitenkin spiking-pitoisuudella 3,7 ng/ml EDTA-plasma näyttäisi antavan parhaimman tuloksen. Tulosten perusteella sopivin näytemateriaali olisi ainakin 1:8 laimennusta käytettäessä seerumi tai hepariiniplasma. (Kuvio 7, Taulukko 8.)

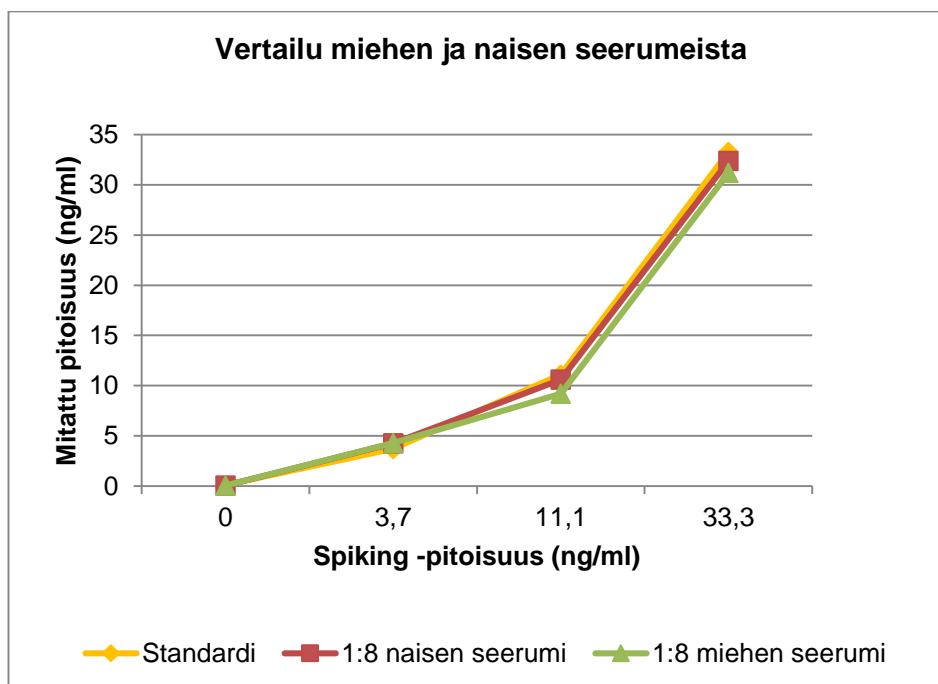


Kuvio 7. Vertailu miehen seerumi-, hepariini- ja EDTA-plasmanäytteistä laimennoksella 1:8

Taulukko 8. Taulukossa miehen seerumin ja plasmojen numeeriset tulokset (ng/ml) laimennoksella 1:8

Standardi	0,1	3,7	11,1	33,3
Spiking	0	3,7	11,1	33,3
1:8 seerumi	0,06	4,3	9,21	31,21
1:8 hepariini	0,06	2,43	10,41	30,81
1:8 EDTA	0,06	3,45	8,16	27,26

Seuraavassa kuviossa on vertailtu miehen ja naisen seerumituloksia laimennoksella 1:8 ja taulukossa nähdään saatujen tulosten numeeriset arvot. Kuvioista ja taulukosta nähdään, että naisen ja miehen seerumeista mitatut tulokset ovat yhtäläiset. (Kuvio 8, Taulukko 9.)



Kuvio 8. Vertailu miehen ja naisen seerumeista laimennoksella 1:8

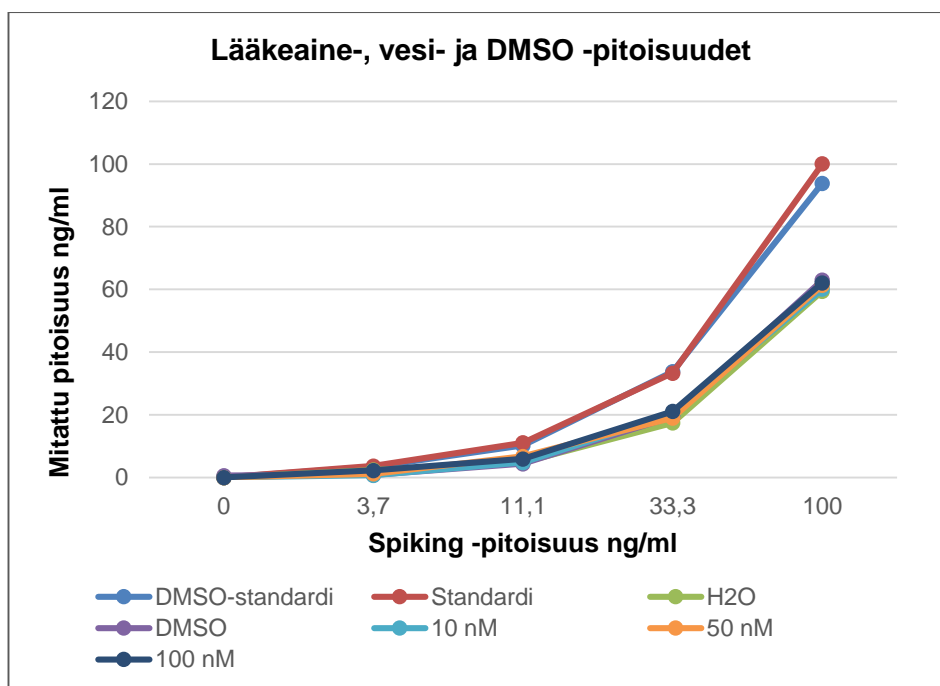
Taulukko 9. Taulukossa miehen ja naisen seerumitulokset laimennoksella 1:8.

Standardi	0,1	3,7	11,1	33,3
Spiking	0	3,7	11,1	33,3
1:8 naisen seerumi	0,06	4,26	10,6	32,39
1:8 miehen seerumi	0,06	4,3	9,21	31,21



### 7.2.2 Osatyö 2: Lääkeaineen vaikutuksen selvittäminen IEMA-testin toimintaan

Kuvaajassa on vertailtu kolmea eri lääkeainepitoisuutta normaaliin standardikuvaajaan ja standardikuvaajaan, johon on lisätty DMSO:a. Näytteet ovat 1:8 laimennettuja seeruminäytteitä, joissa on lääkeainetta pitoisuuksilla 10 nM, 50 nM ja 100 nM viidellä eri spiking-pitoisuudella (0, 3.7, 11.1, 33.3, 100 ng/ml). Kuviossa on myös vertailtu laimennettua DMSO:a ja vesikontrollia standardikuvaajiin, jotta saadaan selville DMSO:n mahdollinen vaikutus IEMA-testin toimivuuteen. Taulukossa 10 on osatyön 2 numeeriset tulokset. Kuviosta ja taulukosta nähdään, että kaikki testatut näytteet ovat antaneet liian alhaiset tulokset. Standardikuvaajat ovat kuitenkin antaneet oikeat odotetut pitoisuudet. (Kuvio 9, Taulukko 10.) Tuloksista voidaan päätellä, ettei ainakaan lääkeaine tai DMSO vaikuta testiin häiritsevästi.

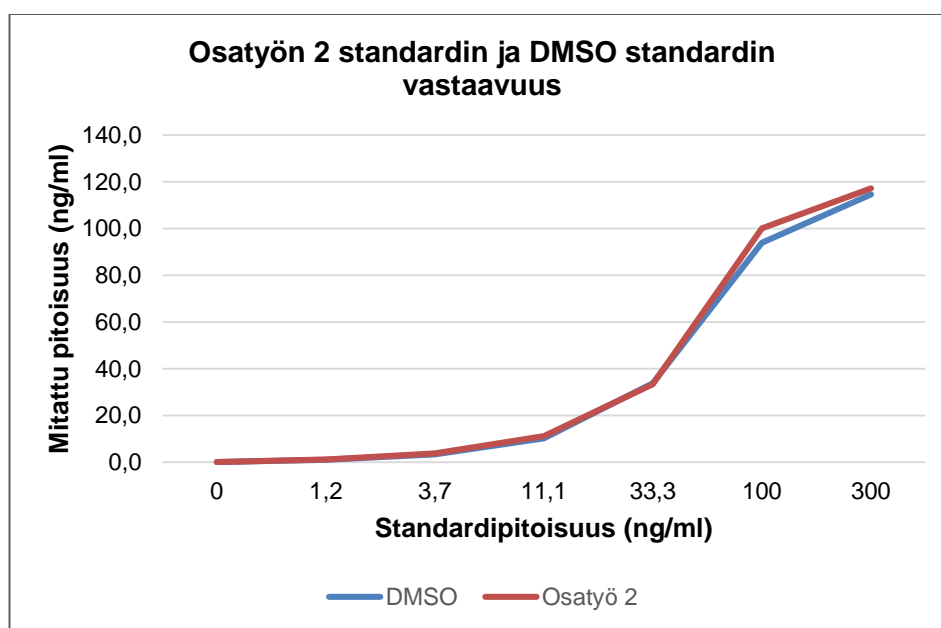


Kuvio 9. Lääkeaine-, vesi- ja DMSO-pitoisuudet 1:8 seerumilaimennoksessa

Taulukko 10. Taulukossa osatyön 2 tulokset ng/ml ja saantoprosentit. Lääkeaineet pitoisuuksilla 10, 50 ja 100 nM sekä DMSO- ja vesikontrollit.

Lääkeaine seeruminäytteet laimennoksella 1:8 ja saantoprosentti										
Spiking ng/ml	H2O	%	DMSO	%	10 nM	%	50 nM	%	100 nM	%
0	0	100	0,6	160	0	100	0	100	0	100
3,7	2,4	64,9	0,84	22,7	0,72	19,5	1,16	31,4	2,24	60,5
11,1	4,8	43,2	4,4	39,6	4,8	43,2	6,76	60,9	5,92	53,3
33,3	17,4	52,4	19,4	58,3	20	60,1	19	57,1	21,08	63,3
100	59,4	59,4	62,96	63,0	60,08	60,1	61,32	61,3	62,08	62,1

Kuviossa 10 on vertailtu osatyön 2 standardin ja DMSO-standardin kuvaajia keskenään. Taulukossa 11 on kyseisten standardien numeeriset tulokset. Kuviosta nähdään, että standardikuvaajat ovat yhtäläiset, eikä DMSO täten vaikuta testin toimintaan. Myös taulukko tukee tätä päätelmää, sillä numeeriset arvot ovat hyvin lähellä toisiaan. (Kuvio 10, Taulukko 11.)



Kuvio 10. Osatyön 2 standardi ja DMSO-standardi vertailu

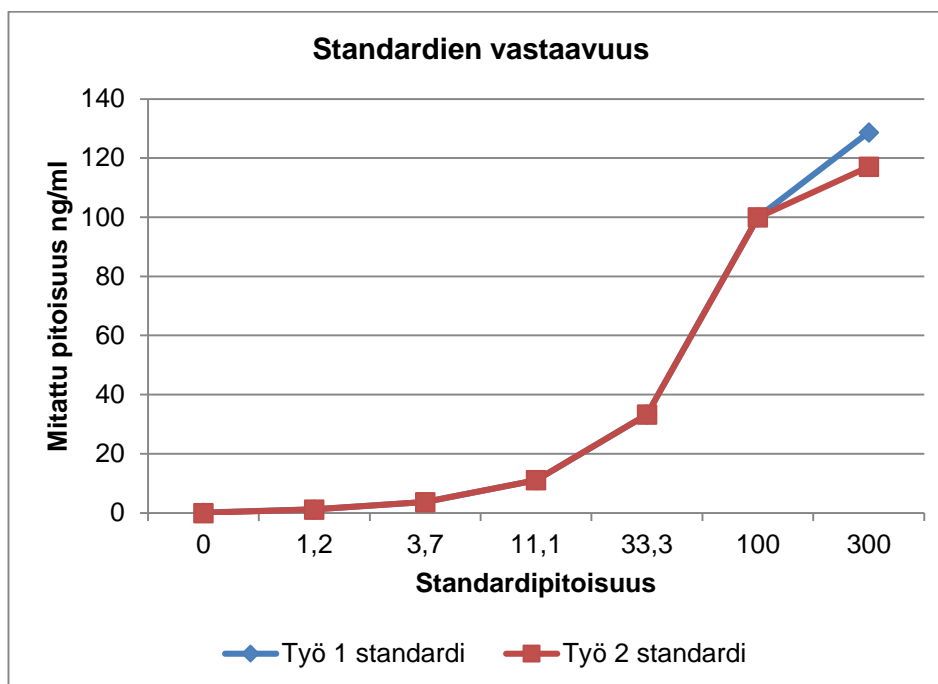
Taulukko 11. Taulukossa standardin ja DMSO-standardin mitatut pitoisuudet (ng/ml)

	<b>0</b>	<b>1,2</b>	<b>3,7</b>	<b>11,1</b>	<b>33,3</b>	<b>100</b>	<b>300</b>
<b>Standardi</b>	0	1,2	3,7	11,1	33,3	100	117,1
<b>DMSO-standardi</b>	0	1,0	3,4	10,2	33,7	93,9	114,5

## 8 Tulosten luotettavuus ja etiikka

Opinnäytetyöhön sisältyvä tutkimus tehtiin noudattamalla Tutkimuseettisen neuvottelukunnan hyvän tieteellisen käytännön ohjeistusta (Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 2012). Opinnäytetyössä esitellyt tutkimustulokset ovat paikkansapitäviä, eikä niitä ole vääristelty. Kaikki työssä tehdyt havainnot ovat raportoitu ja esitelty tässä työssä rehellisesti alkuperäisten tulosten perusteella. Taustatietojen hankintaan on käytetty apuna aiempia tutkimustuloksia ja julkaisuja. Tekijänoikeuksia ja tietojen alkuperäisiä tekijöitä on kuitenkin kunnioitettu käyttämällä asianmukaisia lähdemerkintöjä sekä tekstiviitteitä.

Kuviossa 11 nähdään osatyön 1 ja osatyön 2 standardikuvaajien perusteella, että testi on toistettavissa. Taulukossa 12 on esitetty standardien numeeriset tulokset. Kuvaajat korreloivat keskenään arvojen 0-100 ng/ml välillä. Kuvaajista huomataan, että kumpikaan standardikuvaaja ei anna oikeaa viimeistä pitoisuutta 300 ng/ml. Tämä johtuu ”hook” – efektistä, eli kun näytteen konsentraatio on niin suuri, ettei ylimäärää pystytä enää mittaamaan käytetyllä menetelmällä. Menetelmä on saavuttanut teoreettisen rajansa ja se saturoituu. Tämän seurauksena menetelmä antaa vääriä matalia pitoisuuksia, jos saturoitunut konsentraatiopiste otetaan mukaan standardikuvaajaan. Jättämällä viimeinen piste (300 ng/ml) pois standardikuvaajasta saadaan luotettava pitoisuus määritettyä tämän kuvaajan avulla. (Cruse, Lewis 1995:142.)



Kuvio 11. Standardien vastaavuus osatöiden 1 ja 2 välillä. Y-akselilla mitattu standardikonsentraatio. X-akselilla tunnettu standardipitoisuus.

Taulukko 12. Standardipitoisuudet ja mitatut pitoisuudet ng/ml osatöistä 1 ja 2.

Standardi	0	1,2	3,7	11,1	33,3	100	300
Osatyö 1	0,1	1,2	3,7	11,1	33,3	100,05	128,7
Osatyö 2	0	1,2	3,7	11,1	33,3	100	117,1

Tuloksia voi tarkastella validiteetin avulla, eli tarkastelemalla onko tutkimuksessa mitattu juuri sitä mitä on haluttu mitata. IEMA-testin optimoinnissa oli tarkoitus testata näytemateriaaleilla eri laimennossuhteita sekä tutkia onko miehen ja naisen erilaisten näytemateriaalien välillä eroja. Osatyön 1 validiteetti on korkea, sillä mittauksilla onnistuttiin löytämään vastauksia haluttuihin kysymyksiin. Toisessa työssä oli tarkoitus testata kohdeproteiini-1:een sitoutuvan endometrioosin hoitoon suunnitellun lääkeaineen vaikutusta IEMA-testin toimintaan seeruminäytematriisissa. Osatyön 2 validiteetti on myös korkea ja testillä onnistuttiin saamaan informatiivisia tuloksia mutta toisaalta se herätti myös uusia kysymyksiä ja ongelmia. (Kankkunen - Vehviläinen-Julkunen 2009:152–153.)

Kvantitatiivista tutkimusta tehdessä sen luotettavuutta voidaan arvioida käsitteellä reliabiliteetti, joka tarkoittaa mittarin kykyä tuottaa ei-sattumanvaraisia tuloksia. Tämän

työn tapauksessa IEMA-testi toimii mittarina. Jos IEMA-testi antaa samansuuntaisia tuloksia eri mittauskerroilla eri aineistolla, mittari on reliaabeli. Opinnäytetyössä mitauksia tehtiin kahdelta eri henkilöltä saadulta näytteeltä, joista tehtiin kaksi eri työtä. Opinnäytetyössä tehdyistä mittauksista ei voida sanoa IEMA-testin olevan vielä reliaabeli mittari, sillä mittauksia ja näytteitä tarvittaisiin paljon enemmän mitä tässä työssä käytettiin. (Kankkunen - Vehviläinen-Julkunen 2009:152–153.)

Koska IEMA-testi sekä kohdeproteiini-2 puhdistusprotokolla ovat vielä kehitysvaiheessa niiden validiteetti ja reliabiliteetti voivat vielä muuttua. Varsinkaan tässä vaiheessa proteiinipuhdistuksen validiteettia tai reliabiliteettia ei voida pitää korkeana. Proteiinin puhdistuksesta ei saatu spesifisiä tuloksia puhdistetun proteiinin määrästä tai sen puhdistasteesta. Vaikka proteiinin määrä saatiin laskettua kokeellisen korjauskertoimen avulla, saadut proteiinimäärät eivät ole absoluuttisia. Ei voida myöskään olla varmoja siitä, että onko seassa myös muuta ei-haluttua proteiinia.

IEMA-testin tulosten luotettavuuteen vaikuttaa myös paljon se, että testit tehdään käsitöinä. Tekijöiden kädenjälki ja pipetointitavat vaikuttavat testiin. Oman haasteensa töiden tekoon toi se, että pipetoitavat määrät olivat välillä hyvin pieniä. Virhemahdollisuus on tällöin korkea ja tulokset eivät välttämättä ole täysin luotettavia. Testauksien luotettavuutta kuitenkin nostettiin tekemällä standardeista ja näytteistä rinnakkaismääritykset.

Kaikki laboratoriotyöt suoritettiin huolellisesti ja järjestelmällisesti suunnitelmien mukaan. Proteiinin puhdistusvaiheessa varmistettiin, että ÄKTA prime plus-laite on huollettu ja käyttövalmis ennen puhdistusta. Proteiinipuhdistus dokumentoitiin voimassa olevien työohjeiden mukaan. IEMA-testin optimointia varten tehtiin tarkat työohjeet työelämäohjaajan kanssa ja optimoinnin työvaiheet dokumentoitiin. IEMA-testin optimoinnissa kaikki käytetyt putket numeroitiin ja nimettiin. Putket järjestettiin samaan järjestykseen mistä niistä pipetoitiin näyte kuoppalevylle. Pipetointitarkkuutta nostettiin käyttämällä jokaisen 96-kuoppalevyn kohdalla täyttä pipetin kärkikotelo ja jokaiselle kuopalle omaa pipetinkärkeä. Näin nähtiin mihin kuoppaan on jo pipetoitu näytettä. Pipetointi aloitettiin kuoppalevyn vasemmasta yläreunasta eli ensimmäisestä kuopasta. Pipetoinnissa edettiin järjestelmällisesti kuoppa kerrallaan eikä mitään jätetty välistä.

Eettisyyttä mietittiin opinnäytetyön aikana. Opinnäytetyöhön ei suoranaisesti liittynyt eettisiä ongelmia. IEMA-testin optimoinnissa käytetyt vasta-aineet olivat tuotettu hybri-

doomasoluissa immunisoitujen hiirten avulla, mutta opinnäytetyön tekijät eivät kuitenkaan olleet missään vaiheessa suoraan tekemisissä eläinkokeiden kanssa. IEMA-testin optimointivaiheessa kahdelta Medix Biochemican työntekijältä otettiin verikokeita testejä varten. Näytteenantajat olivat tietoisia mihin heidän näytteitä käytetään ja mihin tuloksia hyödynnetään. Vaikka näytteet otettiin vain kahdelta työntekijältä, tuloksia ei voida jäljittää tiettyihin ihmisiin, sillä ne käsiteltiin anonyymisti.

Opinnäytetyössä puhdistettua antigeeniä voidaan myöhemmin käyttää eläimissä vasta-aineiden tuottoon. Kuitenkin hybridomateknologian avulla voidaan tuottaa vasta-aineita käyttämällä vain vähäisessä määrässä koe-eläimiä. Esimerkiksi hiirien immunisointiin tarvitaan alussa vain muutamia hiiriä ja loput vasta-aineiden tuotosta tehdään soluviljelmillä. Vaikka opinnäytetyöntekijöiden osallistuminen projektiin päättyy, on heidän tarjoamansa työpanos ja tulokset mukana mahdollisissa jatkotutkimuksissa. Immunisointiin liittyvää eläinkoeosuutta voidaan kyseenalaistaa, mutta sen tarjoama hyöty on kuitenkin haittaa suurempi, jos tulevaisuudessa pystytään kehittämään spesifinen testi endometrioosin diagnostiikkaan ja lääkehoito kyseiseen sairauteen.

## 9 Johtopäätökset

### 9.1 Puhdistus

Proteiinipuhdistuksen arveltiin olevan etukäteen haastavaa. Kyseistä kohdeproteiinia ei ole vielä tutkittu paljoa ja aikaisempi kokeilu puhdistamisesta epäonnistui yhteistyökumppanilla. Ennen puhdistusta oli arvioitu, että antigeenin pitoisuus olisi 0,88mg/ml. Opinnäytetyössä tehdyistä puhdistuksista saatiin lopputuotteen pitoisuudeksi kvantitatiivisen arvion mukaan ensimmäisestä puhdistuksesta 0,009 mg/ml ja toisesta 0,012 mg/ml. Tämä on huomattavasti vähemmän kuin arvioitu määrä. Koska lopputuotetta oli niin vähän, SDS-PAGE:ssakaan ei näkynyt minkäänlaisia vyöhykkeitä. Jotta SDS-PAGE:ssa olisi näkynyt vyöhykkeitä, geelille olisi täytynyt laittaa paljon suurempi määrä näytettä. Toista puhdistusta kokeiltiin optimoida laskemalla imidatsolin määrää B-puskurissa. Tulosten perusteella lopputuotetta saatiin hieman enemmän kuin ensimmäisessä puhdistuksessa. Tosin toisessa puhdistuksessa puhdistettavaa näytettä oli 0,1 ml enemmän kuin ensimmäisessä. Loppuen lopuksi myöskään toisen puhdistuksen SDS-PAGE:n geeleissä ei näkynyt värjäyksen jälkeen minkäänlaisia vyöhykkeitä.

## 9.2 IEMA-testin optimointi

IEMA-testin optimoinnissa saatiin selville, että kaikki käytetyt näytemateriaalit toimivat melko samankaltaisesti ja sukupuolten välisissä näytteissä ei ollut merkittäviä eroa. Osatyön 1 tulosten perusteella voidaan todeta, että lähimpänä oikeita laskennallisia tuloksia saatiin naisen seerumilla laimennettuna suhteella 1:8 näytepuskuriin (Kuvio 1, Taulukko 2). Samalla laimennoksella (1:8) saatiin tulokset hyvin lähelle laskennallisia pitoisuuksia myös muilla testatuilla näytteillä. Osatyöstä 1 saatujen naisen seerumlaimennoksien tulosten saantoprosentit olivat myös parhaimmat laimennoksella 1:8, jolloin saantoprosentit olivat välillä 95 - 115 % ja näin ollen hyvin lähellä todellisia. (Taulukko 2). Naisen spiking -pitoisuudella 3,7 ng/ml hepariiniplasma antaa korkeita tuloksia kaikilla laimennoksilla paitsi 1:2. Tämä voi johtua pieptointivirheestä tai kyseisessä plasmanäytteessä voisi olla kiinnostuksen kohteena olevaa luonnollista elimistössä esiintyvää kohdeproteiini-1:tä. (Taulukko 3.)

Myös miehen seerumi- (Kuvio 4) ja hepariiniplasmanäytteistä (Kuvio 5) saatujen tulosten perusteella huomataan, että 1:8 olisi paras laimennossuhde kumpaankin näytematriisiin. Miehen seerumi antoi myös laimennoksella 1:8 parhaimmat saantoprosentit välillä 83–116% (Taulukko 5). Näistä tuloksista voitaisiin tehdä seuraavanlainen johtopäätös: seerumi tai plasma pitää laimentaa vähintään suhteessa 1:8, jolloin tulos saadaan lähelle laskennallisia pitoisuuksia kaikilla spaikatuilla pitoisuuksilla ja tulos on luotettavin kun myöhemmin analysoidaan oikeita potilasnäytteitä.

Miehen ja naisen näytteiden vertailuun on valittu seerumi laimennoksella 1:8, koska työstä saatujen tulosten perusteella kyseinen näytematriisi ja laimennossuhde olisivat sopivin vaihtoehto testin suorittamiseen. Kuvaajasta nähdään, että naisen seerumi korreloi hieman paremmin standardikuvaajan kanssa, kuin miehen seerumi (Kuvio 8). Tosin mittausten perusteella nähdään myös, ettei naisen ja miehen seerumin tulosten välillä ole merkittävää numeerista eroa (Taulukko 9).

Osatyön 1 tulosten perusteella osatyöhön 2 valittiin näytemateriaaliksi ainoastaan seerumia, jota laimennettiin näytepuskurilla 1:8. Testaukseen käytettiin tällä kertaa vain naisen seerumia, sillä vain naisilla esiintyy endometrioosia ja potilasnäytteet tulevat olemaan peräisin naisilta.

Osatyöstä 2 saatujen tulosten perusteella voidaan todeta, ettei lääkeaine itsessään häiritse antigeenin sitoutumista vasta-aineeseen ja HRP-leimattu vasta-aine pystyy sitoutumaan antigeeniin (Kuvio 9). Näytteet, joihin oli lisätty antigeeni, lääkeaine, vesi ja laimennettu DMSO inkuboitui lämpökaapissa +35 C:ssa 10 minuutin ajan. Inkuoimalla haluttiin jäljitellä tilannetta ihmiskehossa. Tuloksista nähtiin, että kaikki inkuboidut näytteet antoivat alemman pitoisuuden kuin molemmat standardikuvaajat (kuvassa standardi ja DMSO-standardi) (Kuvio 9). Myös inkubointinäytteiden vesi- ja DMSO-kontrollit, joissa ei ollut lääkeainetta, antoivat alhaisia konsentraatioita verrattuna standardikuvaajaan (Kuvio 9, Taulukko 10). Tämän perusteella alhaiset tulokset aiheutti jokin muu asia, kuin lääkeaine ja todennäköisesti itse lisätty antigeeni saattoi osittain hajota inkubaation aikana. Toisaalta tulosten perusteella ei voida olla varmoja siitäkään, että oliko lääkeainetta edes sitoutunut mitattaviin antigeeneihin. Oletuksena kuitenkin on, että lääkeainetta olisi sitoutuneena, joten saatujen tulosten perusteella lääkeaine ei vaikuta testin toimintaan häiritsevästi.

Osatyössä 2 käytettiin eri puskuria antigeenin laimentamiseen. Käytössä PBS-puskurin sijaan oli HEPES-puskuri. Puskuri vaihdettiin, sillä Medix Biochemica oli huomannut aiemmissa testauksissa, ettei antigeeni säily PBS -puskurissa. HEPES-puskuri saattoi vaikuttaa osatyön 2 tuloksiin siten, ettei antigeeni pystynyt reagoimaan samalla tavalla kuin aiemmin käytetyssä puskurissa. HEPES-puskurilla saattoi myös olla vaikutusta antigeenin lämpöhajoamiseen inkubaation aikana. Kuitenkin inkuboimaton standardikuvaaja, jossa oli HEPES-puskuriin laimennettua antigeeniä, antoi oikeat odotetut tulokset. Tämän perusteella vaikuttaisi, ettei käytetyllä puskurilla ole väliä.

Mahdollista on, että DMSO vaikutti häiritsevästi tulosten mittaamiseen. Kuten tuloksista nähdään, DMSO-kontrolli antoi tulokseksi 0,6 ng/ml vaikka oletettu tulos oli 0 ng/ml (Taulukko 10). Tämä on kuitenkin vain normaalia heittoa. Verrattaessa DMSO-kontrollin ja vesikontrollin mitattuja arvoja keskenään, niissä ei ole nähtävissä huomattavia eroja (Taulukko 10). Lisäksi DMSO-standardi antoi odotetut tulokset, jotka olivat yhtäläiset myös toisen standardikuvaajan kanssa (Kuvio 10, Taulukko 11). DMSO-standardin ollessa sitä mitä pitääkin, ei HEPES-puskurilla ja DMSO:lla voi olla häiritsevää vaikutusta keskenään, koska HEPES:llä laimennettua antigeenia käytettiin sekä standardisuoriin että näytteisiin. Siispä voidaan olettaa, ettei DMSO aiheuttanut tässä työssä liian matalia tuloksia, eikä se häiritse testin toimintaa.



Lääkeaineen liotuksen jälkeen se piti suojata valolta lääkeyhtiön ohjeen mukaan. Voi olla, että lääkeaine on altistunut liian kauan valolle testin aikana. Tästä johtuen lääkeaine ei välttämättä toimi halutulla tavalla. Kuitenkin myös ne näytteet, joissa ei ollut lääkeainetta, eli vesi- ja DMSO-kontrollit, antoivat liian matalia tuloksia (Kuvio 9, Taulukko 10). Näin ollen valoaltistusta ei voida pitää mahdollisena testiä häiritsevänä tekijänä.

Osatyössä 2 pipetoidut antigeeni- ja lääkeainemäärät olivat erittäin pieniä, mikä toi osaltaan haastetta osatöiden toteuttamiseen. On mahdollista, että aivan tarkkaa määrää ei pystytty pipetoimaan seerumeihin ja näin ollen pipetointi on voinut vähän vaikuttaa tuloksiin. Kuitenkin kaikki tulokset olivat matalia standardipitoisuuksiin verrattuna (Kuvio 9). Jos kyse on pipetoinnista johtuvasta vaikutuksesta, antigeenin määrä olisi ollut luultavasti tällöin suurempi, eikä matalampi halutusta määrästä.

## 10 Pohdinta

Arviot proteiinipuhdistuksen haasteellisuudesta osuivat oikeaan saatujen tulosten perusteella. Jatkotutkimuksia varten proteiinipuhdistusta voitaisiin optimoida tekemällä ohjelman eluutiovaiheeseen porrastettu gradientti, jotta lopputuotetta saataisiin korkeampi pitoisuus. Käytännössä se tarkoittaisi, sitä että eluutiovaiheessa käytettäisiin sekä A että B -puskureita yhtä aikaa tietyillä suhteilla. Porrastetussa gradientissä eluutio aloitetaan pelkästään A – puskurilla. Tietyissä eluutiovaiheissa A- ja B-puskuria käytetään esimerkiksi suhteilla 15 % (B) / 75 % (A). B -puskurin määrä lisätään porrastetusti niin, että lopussa B -puskuria on 100 %. Tämän työn jatkotoimenpiteenä voitaisiin tehdä myös ELISA- tai Western Blot -testaus. ELISA -testissä puhdistettua proteiinia voitaisiin etsiä kohdeproteiini-2:ta vastaan tuotetuilla vasta-aineilla tai Western Blot -testauksessa anti-his-vasta-aineilla.

HEMA-testin optimoinnin osatyötä 1 voitaisiin jatkaa tutkimalla naisen seerumin matriisivaikutuksia eri laimennoksia käyttäen Matrix Spiking -menetelmää. Tässä työssä käytettiin laimennussuhteita 1:2, 1:4, 1:8 ja 1:16. Koska ero laimennoksien 1:8 ja 1:16 välillä on suuri, olisi järkevää tutkia laimennoksia näiden kahden välillä kuten 1:10 ja 1:12. Opinnäytetyössä saatiin oletus, jonka mukaan seerumi täytyy laimentaa vähintään suhteessa 1:8, jolloin tulos saadaan lähelle laskennallisia pitoisuuksia kaikilla spaikatuilla pitoisuuksilla. Oletus siitä, että seerumi aiheuttaa matriisivaikutuksen, vahvistettiin.

Osatyön 2 lisätutkimuksena voitaisiin kontrolloida inkubaation vaikutusta testin toimintaan. Opinnäytetyössä saatiin oletukseksi, että inkubaatio vaikuttaa testin toimintaan hajottaen antigeenin. Jatkotutkimuksena voitaisiin tehdä valmistamalla kaksi sarjaa samanlaisia näytteitä kuin osatyössä 2. Toiset näytteet inkuboidaan +35 C:ssa 10 minuutin ajan ja toisia ei ollenkaan. Tuloksia vertaamalla voidaan katsoa miten paljon inkubaatio vaikuttaa tuloksiin. Jos jatkotutkimuksissa inkuboitumattomat näytteet antavat selvästi alhaisia tuloksia, voitaisiin olettaa lääkeaineen vaikuttavan IEMA-testiin. Jos jatkotestauksissa inkuboitumattomista näytteistä saadaan samantasoisia tuloksia kuin osatyössä 2, lisätyn lääkeaineen määrä voitaisiin nostaa ja katsoa millä tasolla lääkeaine alkaa vaikuttaa. Toisena jatkotutkimuksena seeruminäytteisiin voitaisiin lisätä antigeeniä suuremmilla spiking-pitoisuuksilla ja inkuboida näytteet. Näin voitaisiin tutkia, miten korkeaan antigeenin pitoisuuteen inkubaatio vaikuttaa. Yhtenä jatkotoimenpiteenä on löytää antigeenille sopivampi puskuri, jossa se ei niin helposti hajoa inkubaation aikana.

Proteiinin puhtaudesta ja sen toimivuudesta ei voida tässä vaiheessa sanoa vielä mitään, sillä sitä varten täytyisi tehdä lisää jatkotutkimuksia. Kohdeproteiini-2:n puhdistus ei onnistunut täydellisesti opinnäytetyössä käytetyllä menetelmällä, eikä aivan haluttuun lopputulokseen päästy. Tehty puhdistus ei kuitenkaan epäonnistunut, sillä se toi uutta tietoa jatkotutkimuksia varten. Kohdeproteiini-2:n puhdistusta ei ollut tehty koskaan aikaisemmin Medix Biochemicalla, joten opinnäytetyössä tehtyt ensimmäiset kaksi puhdistusta olivat enemmänkin kokeellisia testauksia jatkotoimenpiteitä varten. ELISA-menetelmällä tehdyissä tutkimuksissa huomattiin seerumin olevan paras vaihtoehto testille laimennossuhteella 1:8. Opinnäytetyön aikana saatiin jatkokehitettyä ja optimoitua endometrioosin diagnosointiin tarkoitettua IEMA-testiä. Täytyy kuitenkin muistaa, että kehitys on vasta alkutekijöissään ja tutkimuksia tarvitaan paljon enemmän. Tutkimukset toivat kuitenkin hyvää dataa jatkotutkimuksia varten. Koska opinnäytetyö oli osa isompaa Medix Biochemican kumppanuus-diagnostiikka tutkimuskokonaisuutta, opinnäytetyön jatkon hyödyt nähdään vasta myöhemmin tulevaisuudessa.

## Lähteet

- 2-D Electrophoresis. Principles and Methods. 2010. GE Healthcare. Opas. Saatavilla myös sähköisesti.  
<[http://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1335426794335/litdoc80642960\\_20141229011805.pdf](http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1335426794335/litdoc80642960_20141229011805.pdf)> Luettu 13.1.2016.
- Advansta 2015. Beware of Matrix Effects in Your ELISA Assay.  
<<https://advansta.com/beware-of-matrix-effects-in-your-elisa-assay/>>. Päivitetty 25.3.2015. Luettu 5.4.2016.
- Aittomäki, Esa – Eerikäinen, Tero – Leisola, Matti – Ojamo, Heikki – Suominen, Ilari – von Weymarn, Niklas – Söderström, Werner 2002. Bioprosessitekniikka. Porvoo: WSOY.
- Antibody Production and Purification Technical Handbook. 2010. Thermo Fisher Scientific. Versio 2. Ohjekirja.  
<[https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Images/integration/1601975\\_AntibodyHB\\_Version2\\_INTL.pdf](https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Images/integration/1601975_AntibodyHB_Version2_INTL.pdf)> Luettu 5.4.2016
- Brown, T.A. 2006. Gene Cloning & DNA Analysis. 5. painos. Iso-Britannia: Blackwell Publishing. 374.
- Campbell, Mary K. – Farrell, Shawn O. 2006. Biochemistry. 5.painos. USA: Thomson Brooks/Cole. 113.
- Cruse, Julius M. – Lewis, Robert E. 1995. Illustrated dictionary of Immunology.USA: CRC Press. 142
- FDA 2014a. In Vitro Companion Diagnostic Devices.Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff. Opas. Saatavilla myös sähköisesti.  
<<http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/UCM262327.pdf>>.
- Gan, Stephanie D. – Patel Kruti R. 2013. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Journal of Investigative Dermatology. 133 (12). 1–3.
- Happonen, Päivi – Holopainen, Mervi – Sariola, Hannu – Sotkas, Panu – Tenhunen, Antero – Tihtarinen-Ulmanen, Marja – Venäläinen, Juha 2013. Bios 5. Bioteknologia. Helsinki: Sanoma Pro Oy.
- Huhtinen, Kaisa – Perheentupa, Antti – Poutanen, Matti – Heikinheimo, Oskari 2011. Endometrioosin patogeneesistä. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. 127 (17). 1827–1835.
- Härkki, Päivi – Heikkinen, Anna-Mari – Setälä, Marjaleena 2011. Endometrioosin nykyhoito. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. 127(17).1837–1847.
- Janeway, Charles A. – Travers, Paul – Walport, Mark – Shlomchik, Mark 2001. Immunobiology. Viides painos. USA: Garland Publishing.
- Kankkunen, Päivi – Vehviläinen-Julkunen, Katri 2009. Tutkimus hoitotieteessä. Helsinki: WSOYpro Oy.

Köhler, G. – Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody predefined specificity. *Nature*. 256 (5517). 495–497.

Paavonen, Jorma 2009. Kipu. Kalso, Eija – Vainio, Anneli – Haanpää, Maija (toim.). Helsinki: Duodecim. 391 – 392.

Medix Biochemica - 30 years of excellence.

<[https://www.medixbiochemica.com/company/company\\_profile/en\\_GB/company/](https://www.medixbiochemica.com/company/company_profile/en_GB/company/)>. Luettu 23.9.2015

Meuleman, Christel – Vandenabeele, Birgit – Fieuws, Steffen – Spiessens, Carl - Timmerman, Dirk – D'Hooghe, Thomas 2009. High prevalence of endometriosis in infertile women with normal ovulation and normospermic partners. *Fertility and Sterility* 92 (1). 68–74.

Mihalyi, A. – Gevaert, O. – Kyama, C.M. – Simsa, P. – Pochet, N. – De Smet, F. – De Moor, B. – Meuleman, C. – Billen, J. – Blanckaert, N. – Vodolazkaia, A. – Fulop, V. – D'Hooghe, T.M. 2010. Non-invasive diagnosis of endometriosis based on a combined analysis of six plasma biomarkers. *Human Reproduction* 25 (3). 654–664.

Nnoaham, Kelechi – Hummelshoj, Lone – Webster, Premila – D'Hooghe, Thomas – de Cicco Nardone, Fiorenzo – de Cicco Nardone, Carlo – Jenkinson, Crispin – Kennedy, Stephen H. – Zondervan, Krina T. 2011. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. *Fertility and Sterility* 96 (2). 366–373.

Overview of ELISA. 2015. Thermo Fisher Scientific.

<<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html#2>> Luettu 4.4.2016.

Perheentupa, Antti – Santala, Markku 2011. Naistentaudit ja synnytykset. 5. uudistettu painos. Ylikorkala, Olavi - Tapaninen, Juha (toim.). Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 93–101.

Protein purification - at the touch of a button. ÄKTAprime plus. 2008. Esite. GE Healthcare. Saatavilla myös sähköisesti.

<[https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1314742967685/litdoc11003488AC\\_20110831014254.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314742967685/litdoc11003488AC_20110831014254.pdf)> Luettu 17.1.2016.

Recombinant protein purification. Principles and methods. 2012. GE Healthcare Bio-Sciences. Saatavilla myös sähköisesti.

<[http://www.gelifesciences.com/file\\_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/Recombinant%20Protein%20Purification.pdf](http://www.gelifesciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/Recombinant%20Protein%20Purification.pdf)> Luettu 23.9.2015.

Suominen, Ilari – Pärssinen, Raimo – Haajanen, Kari – Pelkonen, Jani 2013. Geneiteknikka. 2. korjattu painos. Saarijärvi: Offset Oy. 71.

Thermo Fisher Scientific 2010. ELISA technical guide and protocols. Ohjekirja. Saatavilla myös sähköisesti. <<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TR0065-ELISA-guide.pdf>>.

Thermo Fisher Scientific 2011. Applications Tip of the Week Matrix Spiking – Why Spike and How to Do It. Ohjekirja. Saatavilla myös sähköisesti.  
<<https://static.fishersci.com/cmsassets/downloads/segment/Scientific/pdf/WaterAnalyses/Log112tipMatrixSpikeWhySpikeHowtoDolt.pdf>>.

Tiitinen, Aila 2010. Lapsettomuus. Endokrinologia.

Tuokko, Seija – Rautajoki, Anja – Lehto, Liisa 2009. Kliiniset laboratorionäytteet-opas näytteiden ota varten. Helsinki: Tammi. 37–48.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa  
<[http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK\\_ohje\\_2012.pdf](http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf)> Luettu 9.4.2016

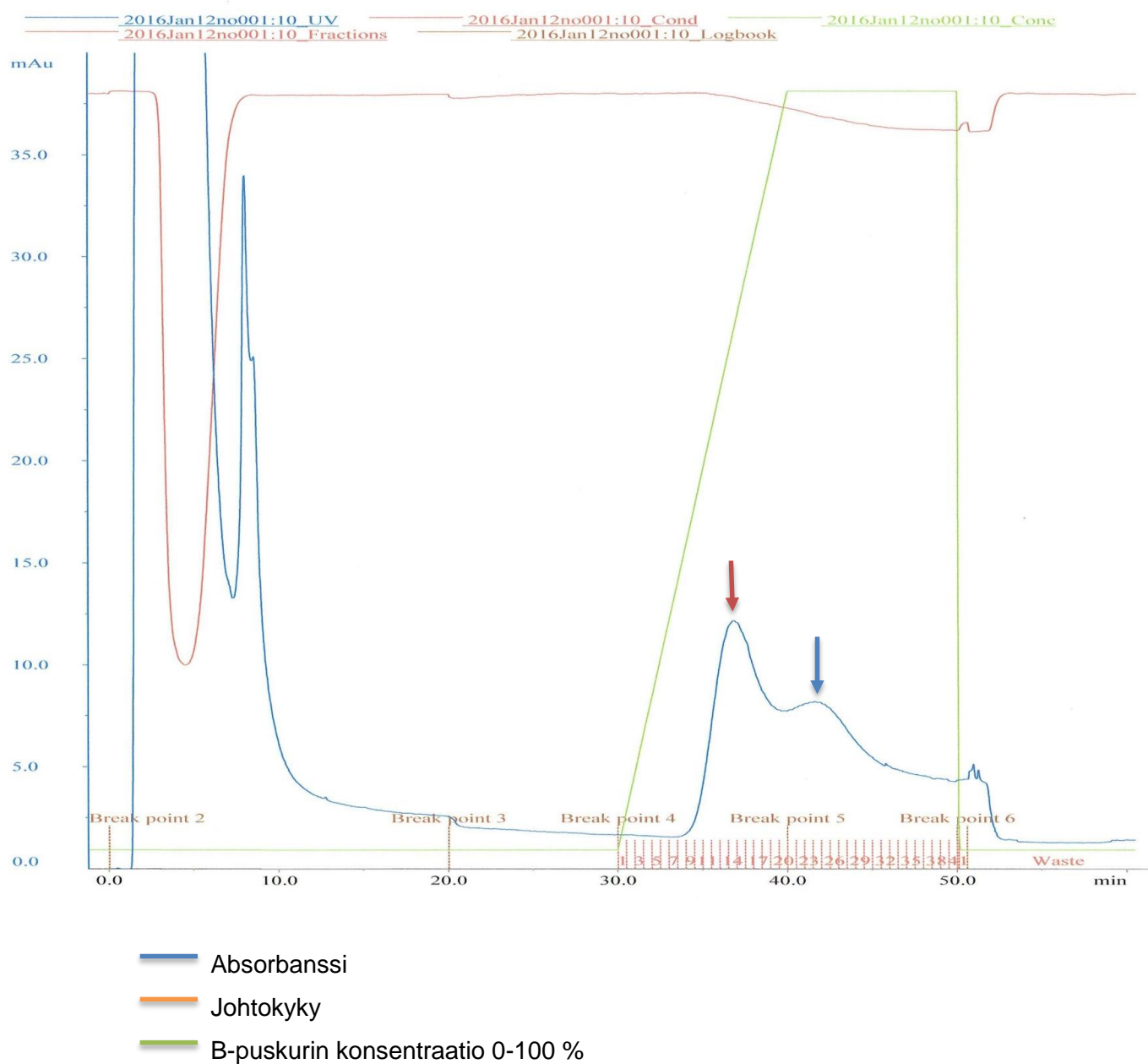
Vodolazkaia, A. – El-Aalamat, Y. – Popovic, D. – Mihalyi, A. – Bossuyt, X. – Kyama, C.M. – Fassbender, A. – Bokor, A. – Schols, D. – Huskens, D. – Meuleman, C. – Peeraer, K. – Tomassetti, C. – Gevaert, O. – Waelkens, E. – Kasran, A. – De Moor, B. - D’Hooghe, T.M. 2012. Evaluation of a panel of 28 biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis. Human Reproduction. 27 (9). 2698–2711.

Waldmann, Thomas A. 2003. Immunotherapy: past, present and future. Nature Medicine 9 (3). 269– 277.

Western Blotting. Principles and Methods. 2014. GE Healthcare Life Sciences. Saatavilla myös sähköisesti.  
<[http://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1334667780708/litdoc28999897\\_20150330003035.pdf](http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1334667780708/litdoc28999897_20150330003035.pdf)> Luettu 3.1.2016.

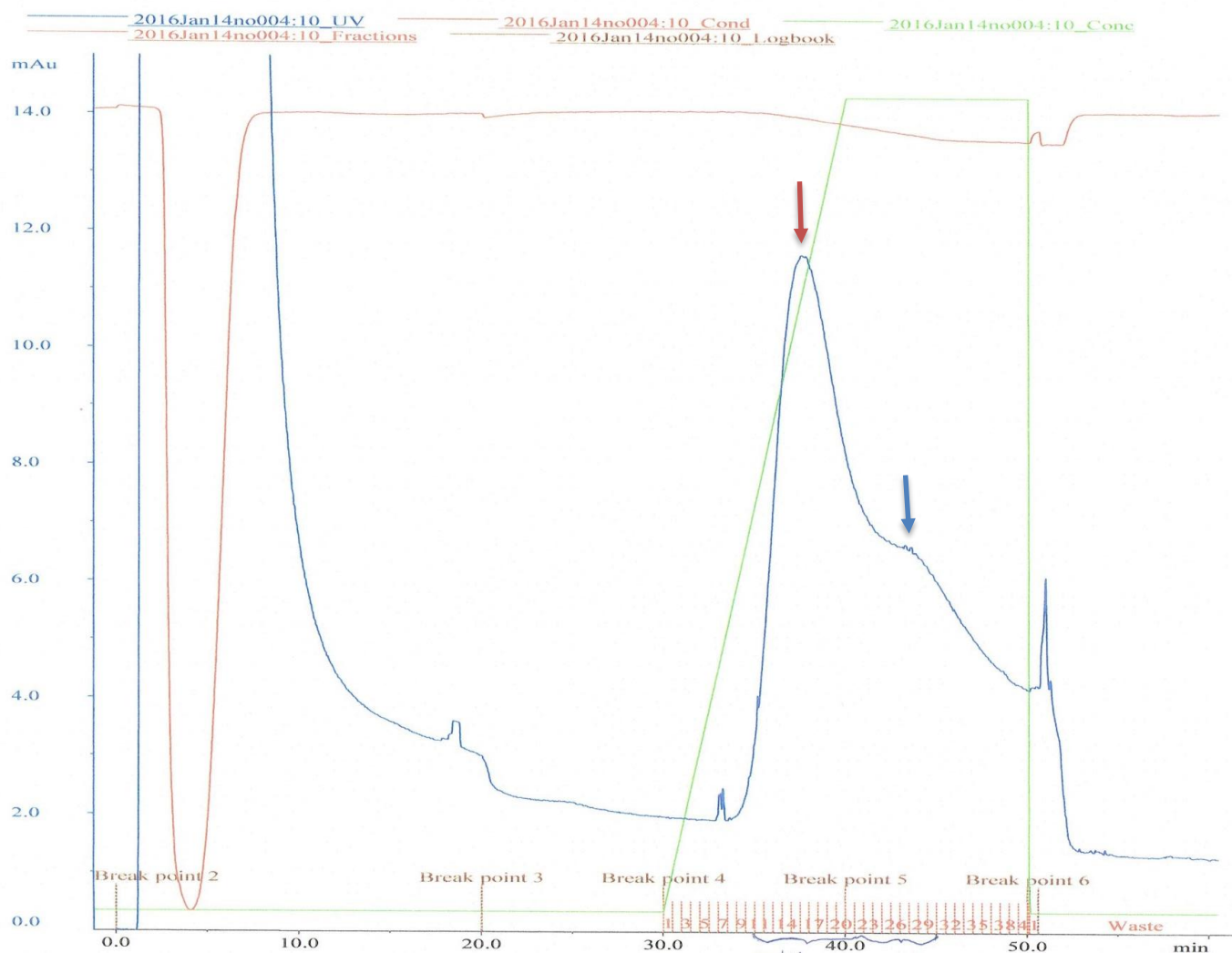
ÄKTA Laboratory-scale Chromatography Systems. Instrument Management Handbook. 2015. GE Healthcare Life Sciences. Saatavilla myös sähköisesti.  
<[http://www.gelifesciences.com/file\\_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/AKTA%20Chromatography%20Systems.pdf](http://www.gelifesciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/AKTA%20Chromatography%20Systems.pdf)> Luettu 20.1.2016.

## Kromatogrammi kohdeproteiini-2:n ensimmäisestä puhdistuksesta



Kromatogrammissa punainen nuoli osoittaa ensimmäisen huipun ja sininen nuoli toisen huipun.

## Kromatogrammi kohdeproteiini-2:n toisesta puhdistuksesta

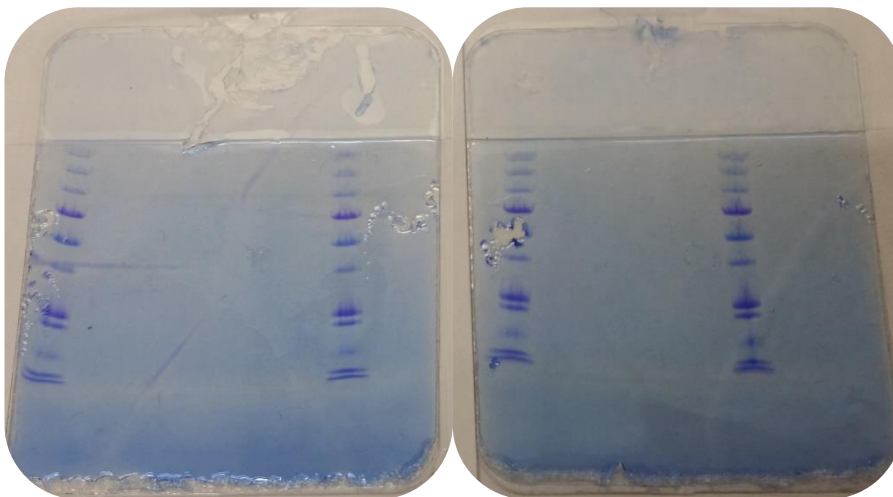


- Absorbanssi
- Johtokyky
- B-puskurin konsentraatio 0-100 %

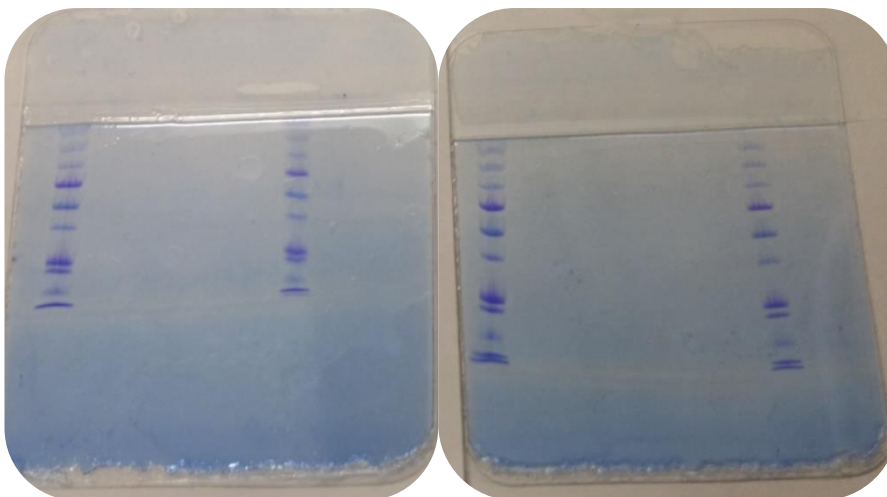
Kromatogrammissa punainen nuoli osoittaa ensimmäisen huipun ja sininen nuoli toisen huipun.

### Kohdeproteiini-2:n puhdistuksista tehdyt SDS-PAGE:t

Ensimmäinen puhdistus:



Toinen puhdistus:





**Osatyö-1:n tuloksia**

Naisen näytteiden konsentraatiot ja saantoprosentit:

Naisen näytteet					
Suhde	Spiking	Seerumi	%	Plasma	%
	0 ng /ml	0,39	139	0,39	139
1:2	3,7 ng/ml	3,5	95	2,47	67
	11,1 ng/ml	5,26	47	6,88	62
	33,3 ng/ml	13,64	41	18,04	54
	0 ng /ml	0,23	123	0,39	139
1:4	3,7 ng/ml	6,96	188	7,23	195
	11,1 ng/ml	9,44	85	10,68	96
	33,3 ng/ml	24,07	72	25,37	76
	0 ng /ml	0,06	106	0,02	102
1:8	3,7 ng/ml	4,26	115	7,03	190
	11,1 ng/ml	10,6	95	11,99	108
	33,3 ng/ml	32,39	97	30,29	91
	0 ng /ml	0	100	0,06	106
1:16	3,7 ng/ml	4,74	128	5,97	161
	11,1 ng/ml	12,49	113	13,64	123
	33,3 ng/ml	33,44	100	35,53	107

Miehen näytteiden konsentraatiot ja saantoprosentit:

Miehen näytteet							
Suhde	Spiking	Seerumi	%	Hepariiniplasma	%	EDTA-plasma	%
	0 ng /ml	0,35	135	0,31	131	0,48	148
1:2	3,7 ng/ml	0,93	25	1,77	48	0,97	26
	11,1 ng/ml	3,37	30	5,02	45	2,8	25
	33,3 ng/ml	11,83	36	17,92	54	7,66	23
	0 ng /ml	0,27	127	0,19	119	0,23	123
1:4	3,7 ng/ml	2,47	67	1,68	45	1,35	36
	11,1 ng/ml	7,19	65	6,45	58	4,62	42
	33,3 ng/ml	22,27	67	25,29	76	17	51
	0 ng /ml	0,06	106	0,06	106	0,06	106
1:8	3,7 ng/ml	4,3	116	2,43	66	3,45	93
	11,1 ng/ml	9,21	83	10,41	94	8,16	74
	33,3 ng/ml	31,21	94	30,81	93	27,26	82
	0 ng /ml	0	100	0,02	102	0	100
1:16	3,7 ng/ml	6,05	164	3,7	100	3,21	87
	11,1 ng/ml	12,72	115	13,99	126	10,6	95
	33,3 ng/ml	32,06	96	34,34	103	36,36	109